

LEADERSHIP

MEDICA

Medicine, Economy, News and Culture for OPINION LEADERS

<http://www.cesil.com>



LESIONI NON PALPABILI DELLA MAMMELLA

Non palpable breast lesions

Fausto Badellino

ALLA RICERCA DEL VIRUS HIV

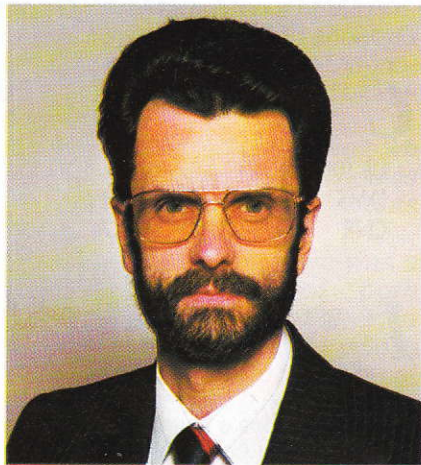
In search of virus HIV

Fabio Franchi

L'ECONOMIA IN AGOSTO: ...COLPA DEL NIÑO ?

The Economy in August:
...is "Niño" to blame?

Gianni Tecchi



IN SEARCH OF HIV

ANALYSIS OF THE VALUE OF THE TESTS USED FOR "HIV INFECTION"

"The task of researchers is to try to falsify as many theories as possible"

Karl Popper

"Is there a danger, in molecular biology, that the accumulation of data will get so far ahead of its assimilation into a conceptual framework that the data will eventually prove an encumbrance? Part of the trouble is that excitement of the chase leaves little time for reflection. And there are grants for producing data, but hardly any for standing back in contemplation".

John Maddox (1)

Abstract:

The diagnosis of HIV infection is made according to the results of particular tests, of which the most important is the Western Blot, also named "confirmatory test". This one, on its turn, may or may not be corroborated by other tests. But, a methodological and comparative analysis of any one of them let one conclude for a complete lack of specificity (and real validity). Antibody tests, viral culture, direct detection of the virus, electronic micrographs of HIV, HIV isolation allow one to find fundamental errors in certain premises and in some essential logical constructions.

The argument that what is not proved by single tests can be proved by them together is not valid from a scientific point of view. The paradoxical result of this critic examination of the matter is that anyone of the phenomena attributed to the virus is explainable without the need to postulate its existence; Electronic micrographs of what has been considered "pure HIV" - and only recently published - seem to confirm this thesis completely.

According to the AIDS infectious theory, the HIV infection is active since from the first phases and during the years and it is very difficult for the organism to get rid of it. Proper tests reveal its presence. Those which at the moment are at our disposal are essential not only for the diagnosis (2), but they are used as indicative elements with prognostic and thera-

ALLA RICERCA DEL VIRUS HIV

Analisi del valore dei test utilizzati per l'"infezione da HIV"

Fabio Franchi

Compito del ricercatore è cercare di falsificare quante più teorie è possibile.

Karl Popper

C'è forse un pericolo nella biologia molecolare, ovvero che l'accumulo di dati si spingerà così oltre alla sua assimilazione in una struttura concettuale, che i dati risulteranno infine d'impaccio? Parte della preoccupazione è che l'eccitamento della caccia lascia poco spazio alla riflessione. E ci sono fondi per produrre dati, ma a stento per fermarsi in meditazione.

John Maddox (1)

Abstract:

La diagnosi di infezione da HIV viene posta in base al risultato di diversi test, di cui fondamentale è il Western Blot, detto test di conferma. Questo a sua volta viene corroborato da altri test. Tuttavia un'analisi metodologica e comparativa di ognuno di essi permette di stabilire l'assenza di validità di ciascuno considerato singolarmente. L'argomento che quanto non sia dimostrato dai test singoli possa essere dimostrato dal loro insieme non è valido dal punto di vista scientifico.

I test anticorpali, la "coltura virale", l'"evidenza diretta del virus", le immagini microfotografiche, l'"isolamento virale" permettono di riscontrare fondamentali errori nelle premesse e in alcuni essenziali passaggi logici.

Il risultato paradossale di questo esame critico è che tutti i fenomeni attribuiti al virus sono spiegabili senza necessità

di postulare l'esistenza dell'HIV. Micrografie elettroniche di quello che sinora è stato considerato "puro HIV" - e solo di recente pubblicate - sembrano confermare pienamente questa tesi.

Secondo la teoria infettiva dell'AIDS, l'infezione da HIV è attiva fin dalle prime fasi e molto difficilmente può essere eliminata dall'organismo nel corso degli anni. La sua presenza è segnalata da appositi test. Quelli attualmente a disposizione sono fondamentali non solamente per la diagnosi (2), ma vengono utilizzati come elementi indicativi ai fini prognostici e terapeutici (3).

Poiché la scienza per definizione è aperta ad ogni controllo ed ogni sua affermazione deve poter essere dimostrata in base a regole logiche, il presente studio si pone l'obiettivo di verificare se vi sia corrispondenza tra i diversi "test per l'AIDS" ed il significato a loro attribuito. Verranno esaminati i principali: quelli anticorpali (ELISA e Western Blot e p24),

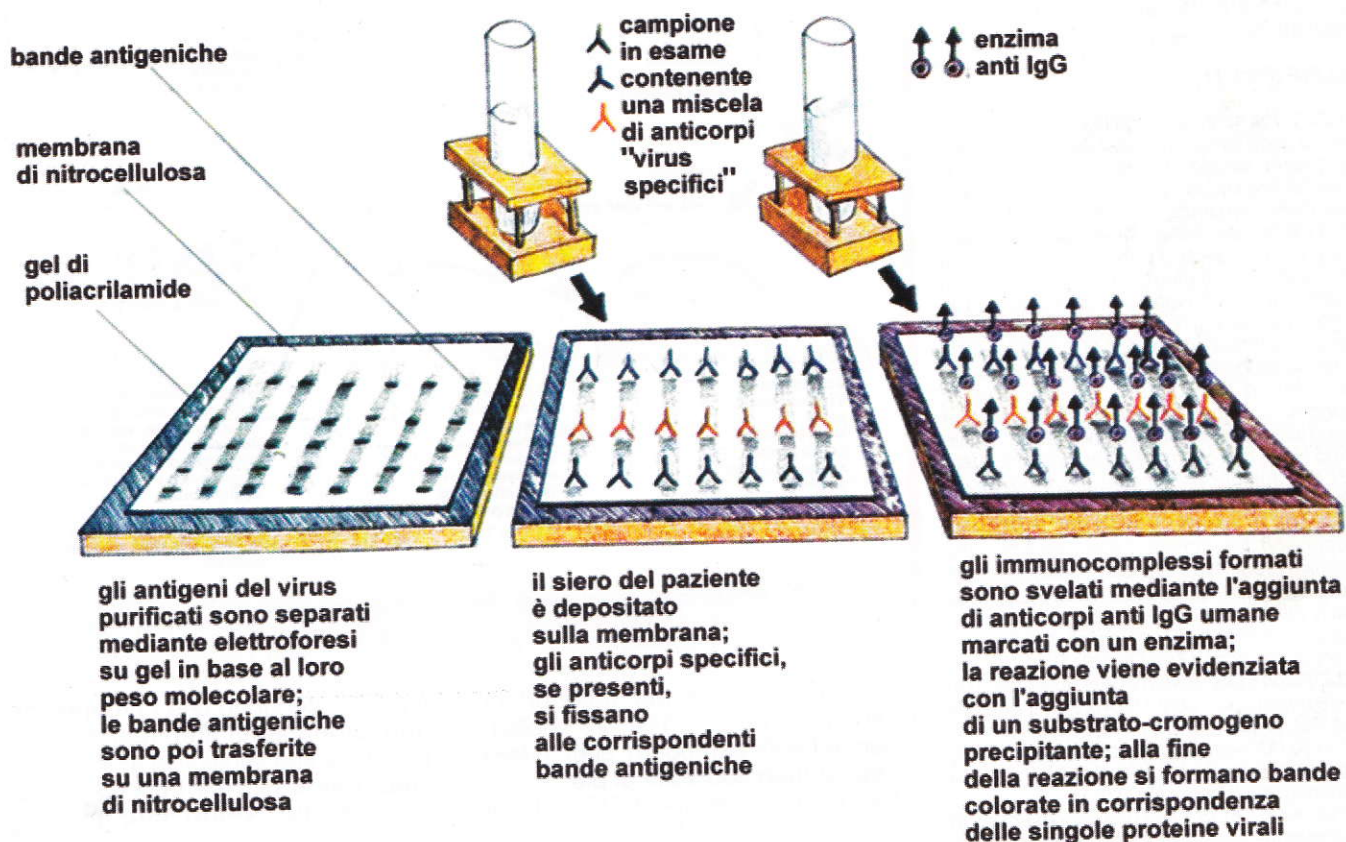


Fig. 1 - Schema di esecuzione del test ELISA
Fig. 1 - ELISA test procedure scheme

l'identificazione del virus tramite la coltura, l'identificazione degli acidi nucleici, la sua caratterizzazione genica, le metodiche d'isolamento, le fotografie del virus.

Verrà analizzato e criticato il procedimento seguito attualmente, come presentato in testi specialistici aggiornati, tra questi "AIDS, Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention" (2) edito nel 1997, di cui un autore è A. Fauci, ex direttore del National Institute of Health.

Ci siamo posti in altre parole l'obiettivo di rispondere alla domanda cruciale come l'avrebbe formulata il grande clinico e studioso di metodologia della scienza prof. Augusto Murri: "Perché devo io credere che il significato dei test dell'AIDS corrisponda a un'infezione con il virus HIV?" Egli considerava indispensabile avere, nella vita come nella professione, un'abitudine, quella di criticare prima di accettare una informazione.

ANALISI DEI TEST ANTICORPALI

I test anticorpali esaminati saranno l'ELISA, il Western Blot, il test di cattura dell'antigene p24.

ELISA (fig. 1)

In Italia, per identificare l'infezione da HIV viene in prima istanza utilizzato un test di screening (ELISA), "dotato di buona sensibilità (vicino al 99%) e minore specificità, stimata attorno al 90-95% nel 1988" (4). Queste percentuali non debbono però trarre in inganno, infatti il valore predittivo del test varia a seconda della prevalenza dell'infezione in una determinata popolazione. Secondo un'ipotesi formulata dalla Commissione Nazionale AIDS nel 1988 (4), in caso di screening della popolazione carceraria italiana, di fronte a 6.902 veri positivi si sarebbero avuti 1.751 falsi positivi;

peutical purposes (3).

As science for definition is open to every control and all its demonstrations must be proved on the basis of logical rules, this study has the object of verifying if there is effective relation among the different "AIDS tests" and the meaning attributed to them. We shall examine the most important: the tests of the antibodies (the ELISA, the Western Blot and the p24), the viral culture, the genetic identification with amplification methods, the viral isolation, the micrographs of HIV. We shall analyse and criticize the procedure followed at present, as presented in the updated specialized texts including "AIDS, Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention" (2) published in 1997, edited by several top researchers including A. Fauci, former manager of the National Institute of Health. In other words we tried to answer to the crucial question as the great clinician and science methodology scholar, prof. Augusto Murri would have formulated it: "Why have I to believe that the AIDS test meaning is equivalent to an infection with the HIV virus?" He thought it was essential, during one's life, to be in the habit of criticizing before of accepting information.

ANALYSIS OF THE ANTIBODY TESTS

The tests of the antibodies we shall examine

are the Elisa, the Western Blot, the p24 antigen capture assay.

ELISA (Pict. 1)

In Italy, the screening test (ELISA), "provided with a good sensibility (near 99%) and a lower specificity, valued about 90-95% in 1988" (4), is used at first to identify the HIV infection. However these percentages must not deceive, in fact the test predictive value changes depending on the infection prevalence in a certain population. According to a theory expressed in 1988 by the AIDS National Commission (4), in case of screening of the Italian prison population, in comparison with 6,902 real positive individuals there should have been 1.751 false positive; on the contrary, in case of blood donors, in comparison with 198 real positive, a good 999,990 should have been false positive (505 times more!). In the over mentioned text (2) the authors assert that the progressive improvements took sensibility of the test to 95% and its specificity to 99.8%, in high-risk population. Nevertheless they admit that "the positive predictive value can greatly fluctuate depending on the population they study". Actually this happened. Depending on the information published on the English authoritative medical magazine *The Lancet* (5), in 1990 on 20.2 million ELISA tests made in Russia, 20,000 were positive, but only 112 were confirmed by the WB; in 1991, on 30 million ELISA tests, a good 30,000 were positive, but of these only 66 were confirmed by the Western Blot, that is a minimum percentage (0.002%).

"Then as the ELISA test has been planned to optimize the sensibility to the detriment of the specificity, it should not be used by itself for the HIV-1 infection diagnosis without a confirmation test (2), although in some Countries is used alone.

Western Blot (pict. 2)

The Western Blot is commonly used as a confirmation test of HIV infection; the combination of the Elisa and the WB should have a "positive predictive value higher than 99% for low-risk and high-risk population" (2). However even the WB does not seem to be so specific as sustained if we analyze some data at our disposal.

A) Even official sources acknowledge that "for reasonable disagreements it was very difficult to code the definition on what a positive Western Blot should be considered" (2). Since 1993, in United States there were just 5 official criteria, and only one (indicated in Du Pont's diagnostic kit) was approved by FDA (Food and Drug Administration). This was the most restrictive one and was used by a few laboratories. If only this criterion had been used, in United States only the 50% seropositive individuals would have been confirmed as really infected (6)! In Italy in a publication of the Health Ministry directed towards G.P. (7), the authors denied there had ever been such a problem. On this subject they affirmed: "in most cases, quite apart from the criterion used, the test results correctly coded when the individual is infect".

The remedy to such a situation was found simply standardizing the different criteria without

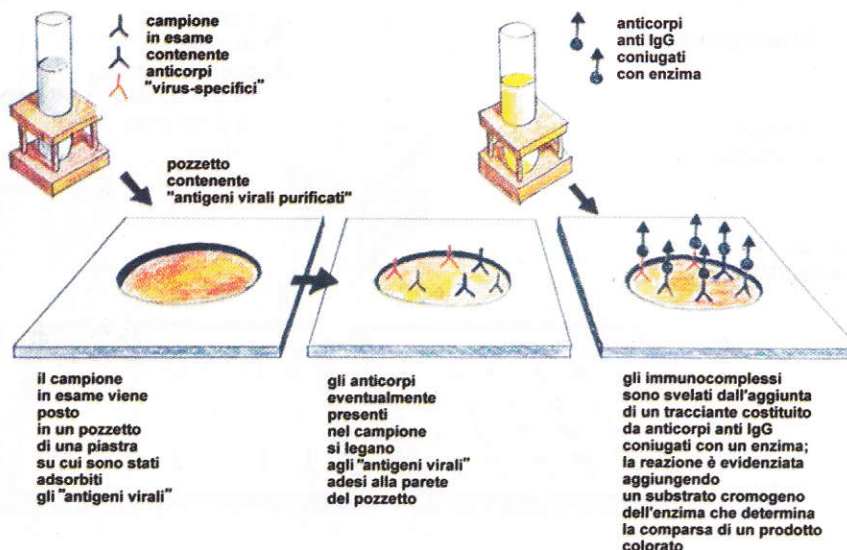


Fig. 2 - Schema di esecuzione del test Western Blot

Fig. 2 - Western Blot test procedure scheme

invece, nel caso dei donatori di sangue, di fronte a 198 veri positivi, ben 99.990 sarebbero stati i falsi positivi (ben 505 volte di più!). Nel libro già citato "AIDS" (2), gli

autori sostengono che i progressivi perfezionamenti del test hanno portato la sua sensibilità al 95% e la specificità al 99,8% in popolazioni ad alto rischio, valori che non si



Fig. 3 - Risultati del Western Blot eseguiti da 19 laboratori di riferimento statunitensi sullo stesso siero del medesimo paziente. E' evidente una grande variabilità

Fig. 3 - WB results from the same serum and obtained by 19 different laboratories are shown (see text)

discostano di molto dai precedenti. Viene però ammesso che "il valore predittivo positivo può fluttuare grandemente in dipendenza della popolazione studiata". In realtà così è avvenuto.

Stando ad informazioni pubblicate sull'autorevole rivista medica inglese *The Lancet* ⁽⁵⁾, nel 1990, in Russia vennero fatti 20,2 milioni di test ELISA, di cui 20.000 risultarono positivi, ma solo 112 vennero confermati con il WB; nel 1991, su 30 milioni di test ELISA, ben 30.000 risultarono positivi, ma di questi solo 66 risultarono confermati dal Western Blot, cioè una percentuale minima (0,002%).

"Dunque il test ELISA essendo stato disegnato per ottimizzare la sensibilità a spese della specificità, non dovrebbe essere usato da solo per la diagnosi di infezione da HIV-1 senza un test di conferma" ⁽²⁾, sebbene in alcune nazioni sia usato da solo.

Il test Western Blot (fig. 2)

Il Western Blot (WB) viene comunemente usato come un test di conferma dell'infezione da HIV; la combinazione dell'ELISA e del WB vanta ufficialmente "un valore predittivo positivo maggiore del 99% per popolazioni a basso rischio e ad alto rischio" ⁽²⁾.

Tuttavia neanche il WB appare così specifico come sostenuto se vengono analizzati alcuni dati a disposizione.

a) Viene riconosciuto persino da fonti ufficiali che "è stato molto difficile codificare la definizione su ciò che dovrebbe essere considerato un Western Blot positivo, a causa di discreti disaccordi" ⁽²⁾.

Fino al 1993, negli Stati Uniti vi erano ben 5 criteri ufficiali, e solo uno (indicato nel kit diagnostico della Du Pont) era stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration). Questo era il più restrittivo ed era usato da pochi laboratori.

Se fosse stato usato unicamente questo criterio, ben il 50% dei sieropositivi negli Stati Uniti sarebbero stati considerati come *non infetti* ⁽⁶⁾!

In Italia, in una pubblicazione del Ministero della Sanità rivolta ai medici di famiglia ⁽⁷⁾, veniva negato che una questione del genere potesse

costituire un problema. Al proposito si affermava: "nella grande maggioranza dei casi, *indipendentemente dal criterio utilizzato*, il test risulta correttamente classificato positivo quando l'individuo è infetto". Il fatto che i risultati potevano essere ben diversi non veniva neppure menzionato.

A tale situazione il rimedio è stato trovato semplicemente uniformando i diversi criteri senza riconsiderare il passato e senza chiarire i motivi scientifici per cui così si è optato.

"I CDC hanno in un secondo tempo identificato i propri con quelli del ASTPHLD e nel 1993 la Croce Rossa statunitense si è adeguata adottando le raccomandazioni del ASTPHLD/CDC" ⁽²⁾. "Secondo l'ente americano ASTPHLD, un risultato positivo deve presentare almeno due delle tre bande maggiori di significato diagnostico (anti-gp41, anti-gp120/160, anti-p24)".

b) La lettura del WB è visiva ed è soggetta perciò ad interpretazione da parte dell'operatore, un fattore di variabilità non trascurabile. "La sua tecnica (*ndr: del Western Blot*) non è stata standardizzata, l'importanza e le conseguenze delle variazioni verificatesi nei laboratori non sono ancora state misurate. I suoi risultati richiedono d'essere interpretati; i criteri per queste interpretazioni variano non solo da laboratorio a laboratorio, ma anche di mese in mese" ⁽⁸⁾.

Il Consorzio statunitense per la Standardizzazione della Sierologia Retrovirale (CRSS) ha effettuato un controllo di qualità inviando 19 quote dello stesso siero a 19 laboratori di riferimento ed il confronto dei risultati ha dimostrato una strabiliante differenza del numero di bande e della loro intensità nelle diverse "striscie" (fig. 3) ⁽⁶⁾.

c) Le preparazioni antigeniche non sono purificate.

"La presenza di bande in posizioni non corrispondenti a noti antigeni virali è un ritrovamento piuttosto comune e si presume sia la conseguenza di contaminanti nella preparazione ...". "Il peso molecolare di queste bande aberranti può variare da ditta a ditta o persino da lotto a lotto della medesima ditta produttrice" ⁽²⁾.

Ecco il commento di Zolla-Pazner

reconsidering the past and without explaining the scientific reasons for which they opted in that way.

Afterwards the CDC identified their criteria with the ASTPHLD's ones and in 1993 the United States Red Cross conformed adopting the ASTPHLD/CDC's advice" ⁽²⁾. "According to the American authority ASTPHLD, a positive result must present at least two of the three main bands of diagnostic meaning (antigp-41, anti-gp120/160, anti-p24)".

B) The reading of the WB is visual and therefore is liable to interpretation from the operator, a variability factor not negligible. "Its technique (note: the Western Blot) was not standardized, the importance and the consequences occurred in the laboratories have not been yet measured.

Their results must be interpreted; the criteria for these interpretations vary not only from laboratory to laboratory, but even from month to month..." ⁽⁸⁾. The Consortium for Retroviral Serology Standardization (CRSS) made a quality control study and sent 19 aliquots of the same serum to 19 different USA reference laboratories. Results comparison has shown an incredible differences of the number of bands and of their intensity ⁽⁶⁾ (pict. 3).

C) The antigenic preparations are not purified. "The presence of bands in positions not corresponding to well-known virus antigens is a rather common finding and we suppose it is the consequence of contaminants in the preparation..." "The molecular weight of these aberrant bands may vary either from company to company or even from lot to lot of the same producing company" ⁽²⁾.

Here is Zolla-Pazner's comment in 1989: "A confusion on the identification of these bands (note: the results of the Western Blot test) resulted in incorrect conclusions in experimental studies. [...] A re-interpretation of the already published results could be necessary" ⁽⁹⁾. Re-interpretation that has never been made.

D) The bands considered "specific" in many cases does not indicate an HIV infection. Some examples follow.

- Even if the more restricting criteria were employed, Lundberg noticed that 10% control sera, which included blood samples from blood banks, had a positive WB ⁽⁶⁾.

- A study ⁽¹⁰⁾ shows that from 2 to 49% tested patients can have a reaction to the WB (unspecified WB), more frequently caused by cross-reacting antibodies.

- A simple vaccination against flu can give a positive result too ⁽¹¹⁾.

- Transfusion of own irradiated blood induces the formation of the same antibodies ⁽¹²⁾.

- Among the homosexuals and bisexuals who resulted negative for ELISA and PCR, 20%-30% can have either one or more bands present in the Western Blot. ⁽²⁾

- There are even more amazing data concerning dogs and published in 1990. Writing on Cancer Research, Strandstrom et al. reported that 72/144 (50%) dog blood samples obtained by the Veterinary Hospital of the University, California, and tested with the Western Blot reacted with one or more HIV recombinant proteins [gp120--21.5%, gp41--23%, p31--22%, p24--43%] ⁽¹³⁾. As the Authors think that dogs can not be infected with HIV, one must conclude that these data are a further prove of



Fig. 4 - Fotografie di "particelle dell'HIV" a sinistra, "particelle non HIV" a destra (in sezioni di linfonodi "infetti" a sinistra, non "infetti" a destra): sono indistinguibili fra loro

Fig. 4 - Photographs of HIV particles at left, non HIV particles at right (in sections of infected lymph nodes at left, non infected at right): they are indistinguishable among them

the frequent antibody cross-reaction with many proteins different from HIV ones".

Remarks: The fact that the bands are considered unspecific if they are found separately, but virus-specific if they are present in a number of two or more, seems to refer not to considerations of a biological kind, but to a convention, a legal agreement changeable in time and space (in fact it is different from nation to nation). According to a convention accepted since a few time ago by many authors, three bands in a clinically healthy blood donor's WB were considered false positive reactions. According to the same convention, three bands of the same blood donor, this time presented to an Insurance Company for a life policy, should be considered true positive.

The researchers group from Perth who analyzed in depth the WB meaning, concluded that the proteins considered viral proteins are not peculiar to HIV, but one cannot distinguish them from proteins of a cellular source. In particular, according to the review by Eleopoulos et al. (14) which has not yet been refuted up to now, the gp41 should correspond with actine; the p18 and p24/25 with the two myosin sub-units (p24 is the unspecific band found more frequently in "uninfected" individuals); the p32 should be identical to the beta chain of the antigen DR of the histocompatibility class II; the gp120-160 should not be other than gp41 oligomers.

The p24 antigen

In U.S.A. the evaluation of the p24 antigen capture test was included among the assays which are carried out to each blood unit (and it is considered as an "HIV direct evidence"). Fauci et al. (2) think that: a) the p24 corresponds to virus capsid antigen (core) which is highlighted by a serum containing the related monoclonal antibodies (anti-p24) associated to a detector system; b) however the test is not useful like a primary screening mean in establishing a precocious HIV infection diagnosis; c) the p24 level increasing corresponds presumably to the blast in virus replication, which can be observed by other methods like plasma viraemia; d) the p24 level usually falls under the determination threshold with conventional methods and like the antibody anti-p24 starts developing during seroconversion and can remain in that state during the following asymptomatic infection years. Only 20-30% of the individuals with asymptomatic infection has detectable levels of p24 serum.

However there are many perplexities on its real meaning. Quantity data indicate that 50 pg and sometimes more of core protein (p24) may be found in seropositive patients. If a retrovirus weight is of 10-3 pg and half of its weight is constituted by p24 (15), then this quantity corresponds to about 100,000 viral particles, according to other authors and on other premises even to 500,000 particles (16)! Then if all this protein came from virions, these patients should be highly viraemic (17, 18). In other words there should be a direct correspondence among the p24 levels, "virus isolation", "viral RNA" levels (said also "viral load"). On the contrary it is not so. Results are irremediably different from the ones one should expect. For example a paper reports the presence of anti-

nel 1989: "Confusione sulla identificazione di queste bande (n.d.r.: i risultati del test Western Blot) è risultata in conclusioni scorrette negli studi sperimentali. [...] potrebbe essere necessaria la reinterpretazione dei risultati già pubblicati" (9). Questa auspicata reinterpretazione non è avvenuta fino al momento attuale (marzo 1998).

d) Bande considerate "specifiche" non indicano in molti casi un'infezione da HIV. Seguono alcuni esempi.

- Pur utilizzando i criteri più restrittivi, Lundberg osservò che ben il 10% dei sierici di controllo, che includevano campioni di sangue dalle banche del sangue, avevano un WB positivo (6).

- In uno studio (10), si rilevava che dal 2 al 49% dei pazienti testati potevano avere una reattività al WB (WB indeterminato), più frequentemente causata da anticorpi cross-reagenti.

- Anche una semplice vaccinazione anti-influenzale può rendere positivo il risultato (11).

- Anche la trasfusione del proprio sangue irradiato produce gli stessi anticorpi (12).

- Tra gli omosessuali o bisessuali che risultano negativi per l'ELISA e la PCR, 20%-30% possono avere una o più bande presenti sul Western Blot (2).

- Dati ancora più sconcertanti riguardano uno studio effettuato su dei cani e pubblicato nel 1990. Scrivendo su Cancer Research, Strandstrom e colleghi riportarono che 72 su 144 (50%) campioni di sangue canino ottenuti dall'Ospedale Veterinario dell'Università di California, e testati con il Western Blot reagivano con una o più proteine ricombinanti dell'HIV [gp120-21.5%, gp41-23%, p31-22%, p24-43%] (13).

Poiché gli Autori considerano i cani non infetti con l'HIV, si deve concludere che questi dati sono una ulteriore prova della frequente cross reattività anticorpale con molte "proteine diverse da quelle dell'HIV". E' importante, a questo punto, introdurre alcune considerazioni.

Il fatto che le bande siano definite non specifiche se ritrovate singo-

lamente, ma specifiche per il virus se presenti in numero di due o più di due, appare rifarsi non a considerazioni di ordine biologico, ma ad una convenzione, ad un accordo di tipo "legale", variabile nel tempo e nello spazio (infatti è differente nelle diverse nazioni).

Secondo una convenzione che era accettata fino a non molto tempo fa da molti autori, tre bande nel WB di un donatore di sangue clinicamente sano erano considerate false reazioni positive.

Secondo la medesima convenzione, le tre bande dello stesso donatore di sangue, questa volta presentate ad una Società di Assicurazione per una polizza sulla vita, sarebbero state considerate vere positive!

Il gruppo di ricercatori di Perth che ha analizzato a fondo il significato del WB, ha concluso che le proteine considerate virali non sono peculiari del virus HIV e sono indistinguibili da proteine di origine cellulare.

In particolare, secondo lo studio finora non confutato della Eleopoulos e coll. (14), la gp41 corrisponderebbe all'actina; la p18 e la p24/25 alle due subunità della miosina (la p24 è la banda aspecifica ritrovata con maggior frequenza in soggetti "non infetti"); la p32 sarebbe identica alla catena beta dell'antigene DR della classe di istocompatibilità II; la gp120-160 non sarebbero nient'altro che oligomeri della gp41.

Antigene p24

La valutazione del test di cattura dell'antigene p24 è stato compreso in USA tra i test che vengono effettuati ad ogni unità di sangue (e considerato come "diretta evidenza del virus HIV").

Secondo Fauci e coll. (2), viene ritenuto che:

a) la p24 corrisponde all'antigene del capsid virale (core) che viene evidenziato da un siero contenente i relativi anticorpi monoclonali (anti-p24) associati ad un sistema rivelatore;

b) il test comunque non è utile come mezzo di screening primario nello

stabilire una diagnosi precoce di infezione da HIV;

c) l'aumentare del livello della p24 presumibilmente correla con l'esplosione nella replicazione virale, rilevabili con altri metodi come la viremia plasmatica;

d) il livello di p24 usualmente cade sotto la soglia di determinazione con metodi convenzionali come l'anticorpo anti-p24, comincia a formarsi durante la sierconversione e può rimanere in quello stato durante i seguenti anni di infezione asintomatica. Solamente il 20-30% di individui con infezione asintomatica ha livelli rilevabili di p24 sierico.

Tuttavia le perplessità sul suo reale significato sono molteplici.

Dati quantitativi indicano che in pazienti sieropositivi possono essere ritrovati 50 pg e talvolta più di proteina del core, la p24.

Se un retrovirus pesa 10^{-3} pg e metà del suo peso è costituita da p24 ⁽¹⁵⁾, questa quantità corrisponde allora a circa 100.000 particelle virali; secondo altri autori e secondo altre premesse addirittura a 500.000 particelle ⁽¹⁶⁾!

Dunque, se tutta questa proteina venisse dai virioni, questi pazienti dovrebbero essere altamente virenici ^(17,18).

In altre parole vi dovrebbe essere una corrispondenza diretta tra livelli di p24, "isolamento virale", livelli di "RNA virale" (detta anche "carica virale"). Invece così non è. I risultati sono irrimediabilmente differenti da quelli che logicamente sarebbero attesi.

Per esempio, un lavoro riporta la presenza di antigenemia ma che nessun virus poté essere isolato da 31 pazienti antigenemici, anche in seguito a coltivazione estesa ⁽¹⁹⁾. Osservazioni analoghe sono riportate da altri studi.

Ne vengono citati alcuni:

1) "in metà dei casi in cui una persona aveva un test positivo, susseguentemente ne aveva uno negativo senza assumere alcuna medicazione che avesse potuto alterare i livelli di p24... il test è clinicamente erratico e dovrebbe essere interpretato molto cautamente" ⁽²⁰⁾.

2) l'antigene p24 non è ritrovato in tutti i soggetti sieropositivi e neppure quelli con AIDS conclamato. In uno studio, la PCR (Polymerase Chain Reaction) e la p24 furono usati per scoprire l'HIV in pazienti in vari stadi, da asintomatici ad AIDS. La p24 fu trovata nel 24% dei pazienti e l'HIV-RNA nel 50% ⁽²¹⁾.

3) Oltre il 29% dei riceventi una

genaemia, but that no virus could be isolated by 31 antigenaemic patients, even after an extended culture ⁽¹⁹⁾.

Other studies report similar remarks. We shall mention some of them:

1) in half of the cases when a person had a positive test, afterwards he had a negative one without making any treatment which could alter the p24 levels... the test is clinically erroneous and should be interpreted with much caution" ⁽²⁰⁾

2) the p24 antigen is found neither in all seropositive subjects nor in individuals with clear AIDS. In a study, the PCR (Polymerase Chain reaction) and p24 were used to detect HIV in patients in various stages, from asymptomatic to AIDS individuals. They found the p24 in 24% and HIV-RNA in 50% of patients ⁽²¹⁾.

3) More than 29% of the patients who receive a transfusion from seronegative individuals, become positive for the anti-p24 antibody ⁽²²⁾, even "on infection absence".

4) The unspecificity of the p24 antigen assay is so obvious to be accepted by an authority recognized in the field, Philip Mortimer et al from Public Health Laboratory Service in England. "Experience proved that neither virus culture, nor p24 tests are of great value in diagnostic tests. They can be either insensible or unspecific" ⁽²³⁾.

Conclusion

The antibody tests (the ELISA, Western Blot and p24 antigen capture assay) for the many reasons over explained, are non able to indicate with reasonable assurance they can face an HIV infection and so the assertion that WB positive predictive value ⁽²⁴⁾ can be considered higher than 99% does not correspond with reality. These tests show reactions of a variable or rather undetermined specificity, so that they cannot allow a distinction between cross-reaction and "HIV infection".

THE DIRECT IDENTIFICATION OF THE VIRUS

It is a common conviction that the antibody tests should be ratified and in a certain way verified from other ones which are able to highlight the virus itself, tests able to identify it directly. However, this direct determination is such only apparently. It can only record some phenomena which are considered associated to the HIV in an unequivocal way. Virus direct identification is divided into 2 main categories (2): the virus culture and the direct identification of the viral nucleic acids (Southern Blot, amplification techniques like the PCR, TR PCR, bDNA, NASBA).

The viral culture

Usually virus isolation involves a patient's cell co-culture with a donor's uninfected cells which have been stimulated with phytoemaglutinine (PHA) for 3 days. These co-cultures are controlled about every 3 days for 28 days or more to control either the syncytia formation and p24 presence or the reverse transcriptase (RT) in culture supernatant ⁽²⁾. The presence either of syncytia (a) or the p24 antigen (b) or the RT (c) is considered a virus replication evidence ⁽²⁾. According to Gallo et other authors even

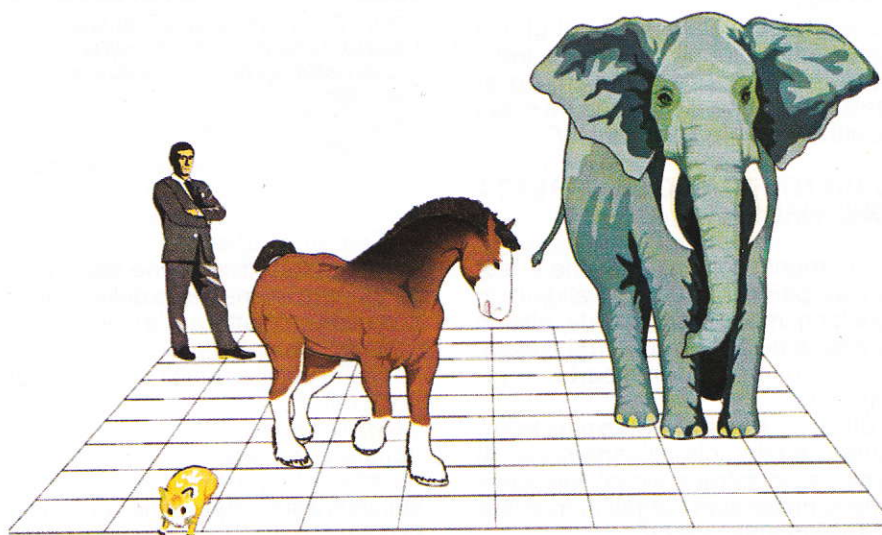


Fig. 5 - Possono questi animali essere considerati quasi - specie dell'uomo? La loro differenza genetica è paragonabile a quella esistente tra i vari genotipi del "virus HIV"!

Fig. 5 - Can these animals be considered quasi species of human being? Their genetic difference is comparable to that present among various "HIV" genotypes

the finding of virus-like particles in culture must be considered a sufficient criterion.

a) The appearance of syncytia.

Syncytia appearance is observed only in considered infected cultures, but these are present even in "uninfected" cell lines and are similar to the ones used for HIV (25). Then such morphological feature could be a characteristic either of the same cell lines, or of the result of the culture conditions or both these factors (14).

b) The p24 antigen.

Its specificity lack has already been mentioned. The objections to use it like a test on the patient's serum are efficacious even for its use in cultures. In a study where this "virus isolation" method was employed (the determination of the p24 in cultures with unfractionated entire blood), positive results were obtained in 49 of 60 "presumably uninfected but serologically undetermined individuals" (82%) and in 5 of 5 seronegative blood donors (26).

c) The reverse transcriptase (RT).

In all the HIV research, the ability of copying template-primer A(n)dT15 - when it is incubated with the supernatant or material coming from infected material co-cultures with the AIDS virus which separates at a 1.16 gm/ml level (sucrose density gradient) - is considered the proof of a reverse-transcriptase activity of HIV. In many cases this activity is considered synonymous of "HIV isolation". However: also the template-primer itself is copied when it is incubated with material which separates in 1.16 band from leukemic cell cultures (27) and uninfected spermatozoa (29); b) the template-primer A(n)dT15 can be transcribed not only by RT, but also by other DNA cell polymerases. All the DNA cell polymerases, alpha, beta and gamma are able of copying the A(n)dT15 (29). In fact, in 1975, an International Conference on DNA which included Baltimore and Gallo (30) on eukaryotic polymerases defined the DNA polymerase gamma, "a normal cell component" (31) which activity can be increased by many factors including the PHA stimulation (32), an enzyme which "copies the A(n)dT15 with high performance, but does not copy well the DNA" (33). From what over explained we may deduce that it is wrong to affirm that such an enzyme activity is peculiar of retroviruses, and less that this is an unequivocal index of the presence of HIV. Particles and proteins which separate at 1.16 mg/ml band level could reflect fully unviral material, most of the same material is certainly cellular and coming from cultures stimulated with PHA (as we shall see better later), since transcriptase activity could derive from it.

d) Objects with a retrovirus appearance.

Gallo considered the finding of retrovirus-like particles in culture like the proof of the HIV isolation (at that time HTLV-III) (34). However Gallo used H9 (HUT78) cell line to isolate HTLV-IIIb, and this cell line releases retrovirus-like particles even when it is not infected with HIV" (35). Weiss obtained his "isolate CBL-1 from the leukaemic cell line CEM, a cell line which hosted retroviruses even when they were not infected with "HIV" (36). In 1970, these particles were frequently observed in leukaemic

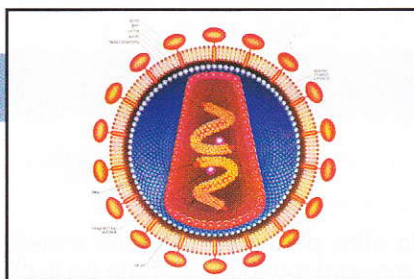


Fig. 6 - Modello dell'HIV, così come è immaginato dal disegnatore
Fig 6. - HIV model, as it imagined by the designer

trasfusione da soggetti sieronegativi, diventa positiva per l'anticorpo anti-p24 (22), pur "in assenza di infezione". 4) La non specificità del test dell'antigene p24 è così ovvia che è accettata da un'autorità riconosciuta nel campo, Philip Mortimer - e i suoi colleghi - del Public Health Laboratory Service in Inghilterra: "L'esperienza ha dimostrato che né la coltura virale, né i test per la p24 sono di gran valore nel test diagnostico. Essi possono essere non sensibili o non specifici" (23).

Conclusione

I test anticorpali (l'ELISA, il Western Blot ed il test di cattura dell'antigene p24) per i numerosi motivi sopra esposti, non sono in grado di segnalare con ragionevole sicurezza di trovarsi di fronte ad un'infezione con il virus HIV e perciò l'asserzione che il valore predittivo positivo (24) del WB possa essere considerato superiore al 99% non corrisponde alla realtà.

Questi test rivelano reazioni di una specificità variabile o meglio indeterminata, tanto da non poter permettere una distinzione tra cross reattività e "infezione da HIV".

L'IDENTIFICAZIONE DIRETTA DEL VIRUS

E' comune convinzione che i test anticorpali siano stati convalidati e in qualche modo verificati da altri in grado di evidenziare il virus stesso, test capaci di identificarlo direttamente.

Tuttavia, questa determinazione diretta è tale solo all'apparenza. Si limita a registrare alcuni fenomeni che si crede siano legati in maniera inequivocabile all'HIV.

L'identificazione diretta del virus è divisa in due principali categorie (2): la coltura virale e l'identificazione diretta degli acidi nucleici virali (Southern Blot, tecniche di amplificazione come PCR, RT PCR, bDNA, NASBA).

La coltura virale

L'isolamento virale usualmente coinvolge una co-cultura delle cellule del paziente con cellule di un donatore non infettate che sono state stimulate con fitoemoagglutinina (PHA) per 3 giorni.

Queste co-culture sono controllate approssimativamente ogni 3 giorni per 28 giorni o più per controllare la formazione di sincizi e la presenza di p24 o la transcriptasi inversa (RT) nel sopranatante della coltura (2).

La presenza di sincizi (a) o dell'antigene p24 (b) o della RT (c) è considerata evidenza di replicazione virale (2).

Secondo Gallo ed altri autori anche il ritrovamento di particelle simil-virali in coltura è da ritenersi criterio sufficiente.

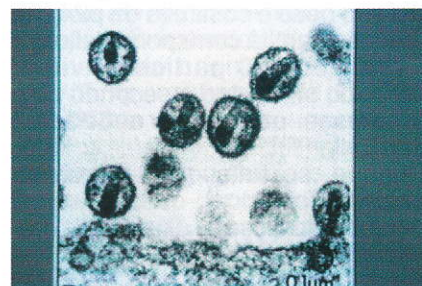


Fig. 7 - Particelle similvirali da sezioni molto sottili di colture cellulari stimulate con ormoni e fitofarmaci

Fig. 7 - Viral like particles of ultra thin sections of cellular culture stimulated by hormones and PHA

a) Comparsa di sincizi

La comparsa di sincizi è osservata solamente in una parte delle colture considerate infette, ma le stesse sono presenti anche in linee cellulari "non infette" e simili a quelle utilizzate per l'HIV (25).

Così tali caratteristiche morfologiche cellulari potrebbero essere una caratteristica delle stesse linee cellulari, del risultato delle condizioni di coltura o di entrambi questi fattori (14).

b) Antigene p24

La sua mancanza di specificità è già stata menzionata. Le obiezioni al suo utilizzo come test sul siero del paziente sono valide anche per il suo

utilizzo nelle colture.

In uno studio in cui è stato utilizzato questo metodo di "isolamento virale" (la determinazione della p24 in colture con sangue intero non frazionato), risultati positivi sono stati ottenuti in 49 su 60 "individui" (82%) presumibilmente *non* infetti ma sierologicamente indeterminati e in 5 su 5 donatori di sangue sieronegativi⁽²⁶⁾.

c) Transcriptasi inversa (RT)

In tutta la ricerca sull'HIV, è considerata quale prova di attività transcriptasica inversa dell'HIV la capacità di copiare lo stampo-innesco (template-primer) A(n).dT₁₅ quando incubato con il sopranatante o il materiale proveniente da co-colture di materiale infetto con il virus dell'AIDS che si separa ad un livello di 1,16 gm/ml (gradiente di densità in sucrosio).

In molti casi questa attività è considerata sinonimo di "isolamento dell'HIV".

Comunque: (i) Lo stesso stampo-innesco è anche copiato quando incubato con materiale che si separa nella banda 1,16 mg/ml da colture di cellule leucemiche⁽²⁷⁾ e spermatozoi non infetti⁽²⁸⁾; (ii) lo stampo-innesco A(n).dT₁₅ può essere trascritto non solo dall'RT, ma anche da altre polimerasi cellulari del DNA. Tutte le polimerasi cellulari del DNA, alfa, beta e gamma possono copiare l'A(n).dT₁₅⁽²⁹⁾. Infatti, nel 1975, una Conferenza Internazionale sulle polimerasi eucariotiche del DNA che comprendeva Baltimore e Gallo⁽³⁰⁾, definì la polimerasi gamma del DNA, "un componente delle cellule normali"⁽³¹⁾, la cui attività può essere aumentata da molti fattori compresa la stimolazione del PHA⁽³²⁾, l'enzima che "copia l'A(n).dT₁₅ con alto rendimento, ma non copia bene il DNA"⁽³³⁾;

Da quanto sopra si deduce che è errato affermare che tale attività enzimatica sia peculiare dei retrovirus, tanto meno che sia indice inequivocabile della presenza del retrovirus HIV.

Le particelle e le proteine che si separano a livello della banda 1,16 mg/ml potrebbero riflettere materiale interamente non virale; sicuramente gran parte dello stesso materiale è cellulare e proveniente da colture stimulate con PHA (come vedremo

meglio in seguito), per cui l'attività transcriptasica potrebbe derivare da esso.

d) Oggetti con l'aspetto retrovirale

Il ritrovamento di particelle simil-retrovirali in coltura fu considerato da Gallo⁽³⁴⁾ prova di isolamento dell'HIV (allora HTLV-III). Tuttavia Gallo, per isolare l'HTLV-III, usò la linea cellulare H9 (HUT78) e tale linea cellulare rilascia particelle simil-retrovirali anche quando "non infetta con l'HIV"⁽³⁵⁾.

Weiss ha ottenuto il suo "isolato CBL-I" dalla linea cellulare leucemica CEM, una linea cellulare che ospitava retrovirus anche quando non infettati con l'"HIV"⁽³⁶⁾.

Nel 1970, tali particelle erano frequentemente osservate nei tessuti leucemici⁽³⁷⁾, in colture di tessuti embrionali^(38,39) e nella maggioranza se non in tutte le placente umane⁽⁴⁰⁾.

Particelle di tipo C mature od estroflesse appaiono in cellule linfomatose metabolicamente danneggiate ma non infette con l'HIV⁽⁴¹⁾.

"Particelle retrovirali" antigenicamente simili all'HIV sono state trovate in estratti da colture di ghiandole salivari di pazienti con la sindrome di Sjorgen⁽⁴²⁾. Più importante ancora, nell'unico studio di microscopia elettronica⁽⁴³⁾, sia in vivo che in vitro in cui furono usati adeguati controlli ed in cui fosse stato effettuato un estensivo esame *in cieco* dei controlli e del materiale del test, vennero trovate "particelle virali indistinguibili dall'HIV" in una varietà di linfadenopatie reattive *non* associate all'HIV, portando gli autori a concludere: "La presenza di tali particelle non indicano, di per sé stesse, un'infezione con l'HIV" (fig. 4).

Conclusione

E' inevitabile convenire che né la presenza di sincizi, né il riscontro della p24, né l'attività transcriptasica inversa, né la presenza di particelle similvirali (insomma ciascun elemento che definisce positiva una coltura dell'HIV) sono "evidenza di replicazione virale", nonostante il significato attribuito sia proprio questo.

mic tissues (37), in embryonic tissue cultures (38, 39) and in most if not in all human placenta (40). Mature and "extroflected" particles of the C pattern appear in lymphoma cells which are metabolically damaged but are not infected with HIV (41). "Retrovirus particles" antigenically similar to HIV were found in extracts from Sjorgen syndrome patient's salivary glands (42). And more important thing, in the only study of electron microscopy (43), both in vivo and in vitro where suitable controls were used and where an extensive assay in cieco of controls and test material was made, "virus particles indistinguishable from HIV were found" in a variety of reactive lymphadenopathies which are not HIV-associated, so that the authors concluded: "The presence of such particles does not indicate, for itself, an HIV infection" (pict 4).

Conclusion: it is inevitable to agree that neither syncytia presence, nor p24 finding, nor reverse transcriptase activity, nor virus-like particle presence (well, each element which settles that an HIV culture is positive) are "a virus replication evidence, though just this is the significance given to it.

Direct identification of the nucleic acids

For direct identification of the nucleic acids one intends the Southern Blot, PCR techniques, the quantitative amplification techniques (RT PCR, bDNA, NASBA). The identification is based on the identification and amplification of little nucleotide sequences attributed to HIV, not of the entire viral genome. This research is made not on cultures, but directly on patient's tissues (including blood).

a) Southern blot technique (technique which allows to separate and highlight nucleic acids of the searched kind).

In 1984 Gallo carried out the first study. Using the Southern blot hybridization technique (capable theoretically of identifying only one infected on ten cells), AIDS patient's tissues were examined, but weak bands were found only in a minority of them (44).

b) The PCR (polymerase chain reaction). The PCR sensibility is valued 92-100% (45) and is able to detect one "infected" cell on 100.000 (2). However, "for its high sensibility, it is greatly liable to false positivity either for even minimum contaminations or other common laboratory mistakes" (2). Retrovirus-like sequences can be found in human genome in every cell (46). Already in 1991, Imagawa and Detels pointed out a potential fallacy of the PCR. "The determination of a part of the genome- they affirmed- does not mean to detect an entire virus" (47).

The problem of the false positives. Many researchers challenge the PCR reability for the great number of false positive that this test should produce (48). The PCR did not prove reproducible and false positives and false negatives were observed in all the 7 reference laboratories involved in an important French study (the concordance with serology varied from 40% to 100%). Moreover, the number of positive results was not significantly diffe-

rent among high and low risk seronegatives (49). There are many other confirmations to these remarks:

1) A validity study in evaluating the HIV PCR performance and in identifying free-cell viral DNA showed "a disturbing high rate of unspecific positivity" employing commonly used primers (SK38, both for the p24 and the gag gene). Really, similar positivity rates were found either for antibody negative samples than for antibody negative samples (18% against 26%) (50).

2) the PCR (qualitative DNA-PCR) made on uninfected infants appeared positive on many occasions (51).

3) In a PCR validity study coordinated by the OMS Work Group on the PCR, 54% of involved laboratories had problems with false positive results; 9.3% of uninfected samples were reported as positive (52).

4) The authors of a multicenter study of quality evaluation stated "this study showed that false positive results, in spite of rigorous procedure algorithms, happen among uninfected individuals with such a frequency to remain a serious problem" (53). The discovery of a considerable number of "false positives" gives evidence of a remarkable PCR specificity lack.

c) Quantitative techniques.

The "quantitative" techniques "should be able to calculate, in an approximate way, the number of virions per milliliter of plasma using opportune modifications of some amplification techniques (either substrate amplification, like RT-PCR and NASBA, or signal amplification, like bDNA). The substrate consists in "preserved regions" of a virus-presumed gene. The calculated sensibility is: for the RNA RT-PCR of 100 HIV RNA copies per milliliter of plasma (2); for NASBA of 1,000 molecules per milliliter (54); for bDNA (branched DNA) of 10,000 molecules per milliliter (2). Up to 1994 HIV was considered to be present in small quantities in asymptomatic and AIDS subject's tissues (1 lymphocyte on 1,000-100,000). In 1995 two studies (55, 56) seemed, on the contrary, to show that HIV replicated with much activity since from the first phases of the infection. The over-mentioned techniques in appearance allowed huge virus quantities, which in a first time had escaped from observation, to be detected.

However if a massive infection were present in infected individuals, as some of the most known experts claim, the Southern blot hybridization would have been more than sufficient to detect it. Don't forget that "either virus DNA scarcity or lack in a considerable patient's part was a surprising result" (57). A John Maddox' significant Freudian slip confirms suspects: according to Maddox "both Ho than Wei and their colleagues were able to come to their alarming conclusions only after a ten years research of the HIV as they teamed up with mathematicians and because they were able to use new techniques to detect the low levels of virus involved" (58)!

Logical incompatibilities of results are macroscopic and evident.

A) In fact there is a lack of correlation between p24 and gene amplification techniques. (We have already mentioned the fact that the p24 is considered to be "the direct proof of HIV

Identificazione diretta degli acidi nucleici

Per identificazione diretta degli acidi nucleici vengono intese le tecniche del Southern Blot, la PCR, le tecniche di amplificazione quantitative (RT PCR, bDNA, NASBA). L'identificazione si basa sul riconoscimento e l'amplificazione di piccole sequenze nucleotidiche attribuite all'HIV, non dell'intero genoma virale.

Tale ricerca viene effettuata non su colture, ma direttamente sui tessuti (compreso il sangue) del paziente.

a) Tecnica del Southern blot (tecnica che permette di separare ed evidenziare acidi nucleici del tipo ricercato)

Il primo studio fu condotto da Gallo nel 1984. Usando la tecnica di ibridizzazione Southern Blot (capace teoricamente di identificare una sola cellula infetta su 10), furono esaminati i tessuti di pazienti con AIDS, ma deboli bande furono ritrovate solo in una minoranza di essi (44).

b) La PCR (Reazione polimerasica a catena)

La sensibilità della PCR è stimata 92-100% (45) ed è in grado di rilevare una cellula "infetta" su 100.000 (2). Tuttavia per la sua alta sensibilità è altamente soggetta alla falsa positività a causa di contaminazioni anche minime o ad altri comuni errori di laboratorio (2).

Sequenze simil-retrovirali sono rinvenibili nel genoma umano in ogni cellula (46).

Già nel 1991, Imagawa e Detels fecero notare una potenziale fallacia della PCR. "La determinazione di parte del genoma - sostenevano - non significa rivelare un virus completo" (47).

Molto importante è il problema dei falsi positivi. Molti ricercatori contestano l'affidabilità della PCR a causa dell'alto numero di falsi positivi che questo test produrrebbe (48). La PCR non si è dimostrata riproducibile e falsi positivi e falsi negativi furono osservati in tutti e 7 i laboratori di riferimento coinvolti in un importante studio francese (la concordanza con la sierologia variava dal 40% al 100%). In più, il numero di risultati positivi non differiva significativamente tra i sieronegativi ad alto e

a basso rischio (49).

Vi sono numerose altre conferme a queste osservazioni:

1) Uno studio di efficacia nel valutare le prestazioni dell'HIV PCR nell'individuare DNA virale libero da cellule dimostrò "un disturbante alto tasso di positività non specifica" usando gli inneschi comunemente utilizzati (SK38/39, per il gene della p24 o gag). In realtà, simili tassi di positività vennero trovati sia per i campioni anticorpo negativi che quelli anticorpo positivi (18% contro il 26%) (50).

2) La PCR (DNA-PCR qualitativa) effettuata su infanti non infetti risultò in diverse occasioni positiva (51).

3) In uno studio di validità della PCR coordinato dal Gruppo di Lavoro sulla PCR dell'OMS, il 54% dei laboratori coinvolti avevano problemi con risultati falsamente positivi; 9,3% dei campioni non infetti erano riportati come positivi (52).

4) Gli autori di uno studio multicentrico di valutazione di qualità, affermarono: "questo studio ha dimostrato che i risultati falsi positivi, nonostante l'uso di rigorosi algoritmi procedurali, capitano tra gli individui non infetti con frequenza tale da rimanere un serio problema" (53).

Il riscontro di un numero rilevante "falsi positivi" depone per una notevole mancanza di specificità della PCR.

c) Tecniche quantitative

Le tecniche "quantitative" sarebbero in grado di calcolare, in modo approssimativo, il numero di virioni per millilitro di plasma utilizzando delle opportune modificazioni di certe tecniche di amplificazione (amplificazione del substrato, come la RT-PCR e la NASBA, o amplificazione del segnale, come la bDNA). Il substrato consiste in "regioni conservate" di un gene presunto virale.

La sensibilità calcolata è: per la RNA RT-PCR di 100 copie di HIV RNA per millilitro di plasma (2); per la NASBA di 1.000 molecole per millilitro (54); per la bDNA (branched DNA) di 10.000 molecole per millilitro (2). Fino al 1994 si riteneva che l'HIV fosse presente in piccole quantità nei tessuti dei soggetti asintomatici e con AIDS e che infettasse poche cellule (1 linfocita su 1.000-100.000).

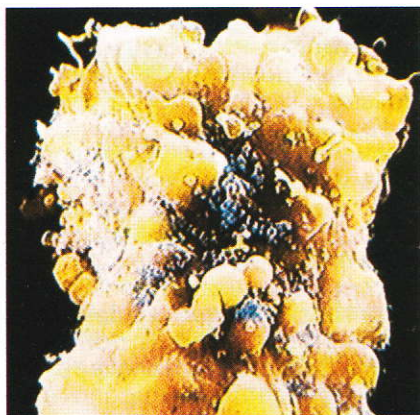


Fig. 8 - Elettromicroscopia elettronica di una cellula circondata da piccole particelle. Senza nessuna prova queste vengono considerate particelle virali (HIV) mentre possono essere semplicemente artefatti della colorazione o particelle cellulari

Fig. 8 - Electronic microscopy of a cell surrounded by a small particles. Without any proof these are considered viral particles (HIV), while they can simply be artefacts of staining or cellular particles

Nel 1995 due studi (^{55,56}) sembrarono dimostrare invece che l'HIV si replicava molto attivamente fin dalle prime fasi dell'infezione. Le nuove tecniche sopra menzionate permettevano apparentemente di rivelare grandi quantità di virus che prima erano sfuggite all'osservazione. Tuttavia se negli infetti vi fosse una massiccia infezione, come alcuni dei più conosciuti esperti sostengono, l'ibridizzazione con il Southern blot sarebbe stata più che sufficiente per rilevarla. Non dimentichiamo che un sorprendente risultato sia con la Southern Blot standard sia con la PCR era "la scarsità o l'apparente assenza del DNA virale in una parte considerevole dei pazienti" (⁵⁷). Un significativo lapsus freudiano di John Maddox conferma i sospetti: secondo Maddox "sia Ho che Wei ed i loro colleghi furono in grado di arrivare alle loro allarmanti conclusioni solamente dopo una decade di ricerche sull'HIV poiché avevano studiato in équipe con dei matematici e poiché essi furono in grado di usare nuove tecniche per rivelare i bassi livelli di virus coinvolto" (⁵⁸)! Le incompatibilità logiche dei risultati sono macroscopiche ed evidenti.

a) Vi è infatti mancanza di correlazione tra p24 e tecniche di amplificazione genica. (Abbiamo già menzionato il fatto che la p24 è considerata "prova diretta di identificazione dell'HIV").

Nessuna correlazione venne trovata tra il livello di p24 e la RT-PCR (⁵⁹). La determinazione della carica virale era altamente sensibile quando paragonata alla misurazione della p24 (più del 95% dei pazienti aveva un carico virale rilevabile mentre solo il 40% aveva una p24 rilevabile), ma nei campioni positivi il livello di antigene e del carico virale aveva una significatività solamente borderline (⁶⁰).

b) Nessuna correlazione venne osservata tra il carico virale quantificato con la NASBA o con Amplicor e la concentrazione con l'antigene p24.

Nessuna correlazione fu osservata tra la dose infettiva, la carica virale determinata con NASBA o con l'Amplicor (RT-PCR) (⁶¹).

c) Vi è mancanza di correlazione anche tra RT-PCR ed altri test.

In uno studio su soggetti vaccinati, un gruppo di quattro campioni di siero risultarono positivi alla RT PCR durante un periodo di 11 mesi, incluso un risultato di circa 10^4 - 10^5 copie / mL, ed un quinto risultato positivo un anno dopo in un soggetto vaccinato, ma "non infetto" (⁶²). Per questo, gli stessi autori avanzarono "dubbi riguardanti la specificità della misura del HIV RNA quale standard aureo per lo screening e la conferma dell'infezione".

d) Vi è infine mancanza di correlazione tra "virus" e "carica virale".

1) Secondo Piatlak, l'alto livello di "virus" nel plasma era 999 per mille "non coltivabile" (⁶³).

2) Ho et al. hanno dimostrato che 10.000 "virioni" plasmatici contati con la PCR ramificata corrispondono a meno di un virus "infettivo" per mL (⁶⁴).

3) In un più recente studio di Ho (⁶⁵) si può constatare che ad una carica di 500.000 unità (!) corrispondevano 0 (zero!) "virus coltivati". Secondo i dati riportati, al paziente 105 prima della cura (con Ritonavir) erano stati riscontrati 643.000 "virioni"/mL, il cui numero è stato calcolato con il branched DNA assay ad esso corrispondevano più

identificazione").

A) No relation was found between the p24 level and the RT-PCR (⁵⁹). The determination of the viral charge was highly sensible when it was compared with the p24 measurement (more than 95% of patients had detectable virus charge while only 40% had detectable p24), but in positive samples antigen and viral charge level had only a borderline significance (⁶⁰).

B) No relation was observed between viral charge quantified either with the NASBA or the Amplicor and the concentration with the p24 antigen. No relation was observed between the infectious dose, the viral load found either with the NASBA or the Amplicor (RT-PCR) (⁶¹).

C) There is a relation lack between RT-PCR and other assays. In a study on vaccinated subjects, a group of four serum samples resulted positive with RT PCR during a 11 months period, including a result of 104-105 copies/mL, and an year later a fifth positive result in a vaccinated subject, but not infected" (⁶²). For this reason, the authors advanced "doubts concerning specificity of HIV RNA measurement as a golden standard for the screening and the infection confirmation".

D) There is finally a lack of correlation between "virus" and "viral load".

1) According to Piatlak, the high "virus" level in plasma was 999 per 1,000 "unculturable" (⁶³).

2) Ho et al. showed that 10,000 plasma "virions" counted with the branched PCR correspond with less than one "infectious" virus per mL (⁶⁴). 3

) In a more recent study by Ho (⁶⁵) one may notice that 0 (zero!) "cultured viruses" corresponded to a load of 500,000 units! According to the reported data, to patient 105 before the treatment (with Ritonavir) 643,000 "virions"/mL were detected, where the number was calculated with the branched DNA assay, more than 1,000 TCID₅₀/mL corresponded to it (50% tissue culture infectious doses). After a two day therapy and in following days the "cultivable virus" was 0 (zero). In the meantime, at 2, 3 and 4 days "free virions" (that is the so-called "viral charge") remained over 500,000. Till 7 day "virions" were again over 100,000. A virion is defined as a complete viral particle constituted with the viral nucleic acid, capsid and pericapsid (when present). The possible objection for which a defective virion is "seen" by branched DNA assay, but is not detected by culture samples, does not resolve the problem of non-correspondence with the other tests and the impossibility of seeing these particles at the microscope directly from patient's tissues, without culture transfers. If it were so, Gallo would not need for applying to frauds (⁶⁷, ⁶⁸), he would not call for three year tireless researches in order to find something which had the appearance of a virus. He would have come to it immediately with other researchers. Mark Craddock, professor at the School of Mathematics and Statistics, The University of Sidney, Australia commented: "What is this viraemia of billions of RNA particles that can only be seen with an undocumented branch-PCR or PCR but not with a functional infectivity

test?". (68)

VIRAL GENOME

As already stated, genomic amplification techniques concern small segments, not surely the complete "viral" genome and the results which are obtained do not give the assurance to have the true "HIV", besides they are frankly discordant. At this point it's legitimate to ask what is really and how it's made the original viral genome. The research group from Perth (69) notes that if an unique AIDS retrovirus existed, then less than 1% genomic differences should be the rule, not the exception. For instance, the type 3 Sabin poliovirus vaccine differed from its neurovirulent progenitor at only 10 nucleotide positions after 53 in vitro and 21 in vivo passages in monkey tissues. In 1977, H1N1 influenza A virus reappeared in the human population after 27 years of dormancy with sequences mainly identical to those of the 1950s virus. Although Eigen's quasispecies model has been used to describe the genome of RNA viruses, even 1% sequence differences in these genomes are considered to represent "extreme variability". "Many selective forces may stabilize virus populations. These stabilizing factors may include the need for conservation of protein structure and function, RNA secondary structure, glycosylation sites, and phosphorylation sites". Let us see what is the picture offered by HIV research. Not long afterwards it was discovered that "If you were to test two HIVpositive people at random and analyse the genetic material of their strains, they would differ, on average, by about 13 percent" (70). Besides what is considered to be the genotype of HIV comes from sequence analysis of subgenomes that HIV genotype consignments are derived from sequence analysis of subgenomes measuring 2% to 30% of the total (71). The data is that such "genomes" vary between 3-40% (72,73). "If 30% of the HIV genome varies as much as 40%, how much does 100% of the HIV genome vary? This is the legitimate question of Eleopulos and colleagues (69).

Among researchers there is disagreement also about the number of HIV genes. In 1988 they said HIV genome had eight genes (74), in 1990 ten (75). In 1996 Montagnier referred that HIV had eight genes (76), and according to Barré-Sinoussi, HIV has nine genes (77) Not even the number of nucleotides of HIV genome seems to be constant (69)

HIV quasi-species

Because great genomic differences were found - even the same person can harbor more than 106-108 genetically distinct variants (78) - to try to find a justification for this phenomenon, the concept of quasi-species has been introduced. Prior to the 1990s, the HIV sequences were classified as African and USA/European with sequence differences of 20-30 percent between these two groups. (79). In the 1990s, HIV researchers started to divide the "HIV genome" into subtypes A, B, C, D, E, etc. The basis for this classification system is: "(a) subtypes are approximately equidistant from one another in env; (b) the env phylogenetic tree is for the most part congruent with gag

di 1.000 TCID- 50/ml (50% tissue culture infectious doses). Dopo due giorni di terapia e nei giorni seguenti il "virus coltivabile" era 0 (zero). Nel contempo, ai giorni 2, 3 e 4 i "virioni liberi" (ovvero la cosiddetta "carica virale") restava superiore a 500.000. Fino al giorno 7 i "virioni" erano ancora superiori a 100.000.

Un virione è definito come una particella virale completa costituita dall'acido nucleico virale, dal capsido e dal pericapside (quando presente). La possibile obiezione che un virione difettivo venga "visto" dal branched DNA assay, ma non venga rilevato dai saggi culturali, non risolve il problema della mancata corrispondenza con gli altri test e con l'impossibilità di vedere queste particelle al microscopio direttamente dai tessuti del paziente, senza passaggi culturali.

Fosse stato così, Gallo non avrebbe avuto bisogno di ricorrere a frodi (66,67), non avrebbe avuto bisogno di tre anni di indefesse ricerche per trovare qualcosa che avesse l'aspetto di un virus. Ci sarebbe arrivato immediatamente assieme ad altri ricercatori.

Mark Craddock, professore della School of Mathematics and Statistics, The University of Sydney, Australia ha commentato: "Cos'è questa grande viremia di miliardi di particelle di RNA che possono essere visti solamente con una tecnica non documentata (branched-DNA) o la PCR ma non con test funzionale di infettività" (68)?

IL GENOMA VIRALE

Come già detto, le tecniche di amplificazione genica riguardano piccole frazioni, non l'intero genoma "virale" ed i risultati ottenuti non danno la sicurezza di trovarsi di fronte all'HIV, tanto più che sono francamente discordanti. A questo punto è perciò legittimo domandarsi qual è veramente e com'è fatto l'originale genoma virale.

Innanzitutto il gruppo di ricercatori di Perth (69) osserva che "se ci fosse un singolo retrovirus dell'AIDS, un unico retrovirus, allora le differenze genomiche inferiori all'1% dovrebbero essere la regola, non l'eccezione.

Per esempio, il vaccino al poliovirus

Sabin del tipo 3 differiva dal suo progenitore neurovirulento in solo 10 posizioni nucleotidiche dopo 53 passaggi in vitro e 21 in vivo nei tessuti di scimmie. Nel 1977, l'influenza virale A H1N1 riapparve nella popolazione umana dopo 27 anni di inattività con sequenze principalmente identiche a quelle del virus del 1950".

Sebbene si sia usato il modello della quasispecie di Eigen per descrivere il genoma dei virus dell'RNA, differenze di sequenza anche dell'1% in questi genomi vengono considerate rappresentare "estrema variabilità". "Molte forze selettive possono stabilizzare le popolazioni virali.

Questi fattori stabilizzanti possono racchiudere la necessità della conservazione della struttura e della funzione delle proteine, una struttura secondaria dell'RNA, siti di glicosilazione e siti di fosforilazione.

Vediamo ora qual è il quadro offerto dalla ricerca sull'HIV.

Fu presto scoperto che "se si testassero due sieropositivi a caso e si analizzasse il materiale genetico del ceppo di uno e dell'altro, essi differirebbero, in media, di circa il 13%" (70). Inoltre, quello che viene considerato il genotipo dell'HIV deriva dalle analisi di sequenza di subgenomi che misurano dal 2% al 30% del totale (71). Il dato sconcertante è che tali "genomi" variano fino al 40% (72,73). "Se il 30% del genoma dell'HIV varia fino al 40%, di quanto varia il 100% del genoma dell'HIV?" è la legittima domanda della Eleopulos e coll. (69).

Non c'è accordo tra gli studiosi sul numero di geni dell'HIV.

Nel 1988 si diceva che il genoma dell'HIV consisteva in 8 geni (74), nel 1990 in dieci (75). Nel 1996 Montagnier ha riferito che l'HIV possiede otto geni (76) e secondo Barré-Sinoussi, l'HIV ha nove geni (77).

Nemmeno il numero dei nucleotidi nel "genoma dell'HIV" sembra costante (69).

Le quasi specie

Poiché venivano riscontrate grandi differenze genomiche - persino nello stesso individuo albergherebbero almeno 10^6 - 10^8 "varianti genotipiche" (78) - per tentare di giustificare tale

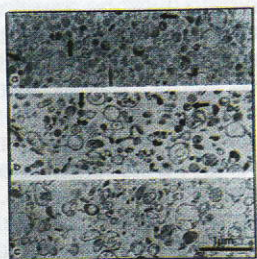


Fig. 9 - Fotografia del materiale isolato al gradiente di concentrazione in cui dovrebbe trovarsi il "puro HIV" e che invece dimostra la sua assenza. "Le preparazioni dell'HIV purificato sono contaminate da vescicole cellulari. Vescicole purificate da cellule H9 (a), PBMC attivate (b) e cellule H9 non-infette (c)"

Fig. 9 - Photograph of material isolated from density gradients in which it had to be the pure HIV and that on the contrary shows its absence. "Purified HIV-1 preparations are contaminated by cellular vesicles. Purified vesicles from infected H9 cells (a), and activated PBMC (b) or from non-infected H9 cells (c)"

fenomeno è stato introdotto il concetto di "quasi-specie".

Prima degli anni '90, le sequenze dell'HIV erano classificate come europee/statunitensi con differenze della sequenza del 20-30% tra questi due gruppi (79).

Negli anni '90, i ricercatori dell'HIV hanno cominciato a dividere il genoma HIV nei sottotipi A, B, C, D, E, etc.

La base di questo sistema di classificazione è: "(a) i sottotipi sono approssimativamente equidistanti uno dall'altro nel gene *env*, (b) l'albero filogenetico *env* è per la gran parte congruente con l'albero filogenetico *gag*, (c) due o più campioni sono richiesti per definire un sottotipo di sequenza".

Tuttavia, "Sono sorti dei problemi nel nominare i sottotipi. Un numero piccolo ma non insignificante di sequenze virali sono ibride, ovvero si possono riunire, per esempio un sottotipo di sequenza del *gag* con un altro tipo di sequenza dell'*env*, ... Il nominarli diventa problematico quando sorgono forme altamente divergenti di un dato sottotipo: tali forme sono talvolta designate come A', B', F', ecc. E' sempre più

necessario avere dei dati che codificano le sequenze sia del *gag* che dell'*env* quando si sta rivendicando una nuova forma o sottotipo" (80).

Verso la metà del 1996 erano stati descritti "almeno dieci" (A-J) genotipi dell'HIV-1 principali (M) prevalenti e quelli a bassa prevalenza (O) e nuovi genotipi vengono ancora segnalati (81,82).

E' quindi possibile descrivere i "DNA dell'HIV", anche se hanno una variazione del 10%, per non menzionare il 20 o il 30 o il 40%, come una "popolazione di genomi strettamente imparentati, e riferirsi ad essi come a quasispecie" (69)?

L'estrema variabilità del genoma dell'HIV induce a chiedersi che senso abbia riferirsi all'HIV come ad una entità dalla precisa fisionomia. La differenza genomica tra uomini di razza diversa si aggira attorno all'1 per 1.000, tra uomo ed orang-utan al 2%, ma per trovare una differenza del 30%, bisogna confrontare nientemeno che uomo e topo, uomo e asino, uomo ed elefante! Possono correttamente ritenersi il topo e l'asino e l'elefante quasi-specie dell'uomo (fig. 5)?

PARTICLE DETECTION (identificazione di particelle)

I Retrovirus sono definiti come particelle con rivestimento di circa 100-120nm di diametro con un core che comprende un involucro proteico e un complesso di ribonucleoproteina.

I Retrovirus sono classificati in tre sottofamiglie: Spumavirinae, Lentivirinae and Oncovirinae.

I Retrovirus appartenenti all'ultima sottofamiglia sono divisi in particelle di tipo A, B, C e D.

A quale di questi debba appartenere l'HIV, non è ben chiaro. Secondo Gallo nel 1984 si trattava di una particella di tipo C, ma nel 1985 ammetteva che poteva essere anche del tipo D (83).

Montagnier e colleghi riportarono inizialmente che era una particella di tipo C (84), quindi di tipo D (85), e quindi un lentivirus (86), ovvero di un'altra sottofamiglia. Secondo Munn ed altri il virus dell'AIDS presenta caratteristiche del tipo C, del tipo D e dei lentivirus (87). Fauci ed altri descris-

phylogenetic trees; (c) two or more samples are required to define a sequence subtype". However, "Subtype naming problems have arisen. A small but not insignificant number of viral sequences are hybrid, clustering with one sequence subtype in *gag* and another sequence subtype in *env*, for example;... Naming becomes problematic when highly divergent forms of a given subtype arises: such forms are sometimes designated A', B', F', etc". It is increasingly necessary to have sequence data from both *gag* and *env* coding sequences when a new form or subtype is being claimed" (80). By the middle of 1996 "at least ten" (A-J) prevalent major (M) and a low prevalence, O, HIV-1 genotypes were described and new genotypes are still reported (81,82). Is it possible then to describe the "HIV DNA" even if it has variation of 10%, not to mention 20 or 30 or 40% as is the case, as a "...population of closely related genomes, referred to as a quasispecies" (69)? The extreme variability of HIV genome make us ask what is the sense to refer to HIV as a clear distinct entity. The genomic difference among human being of different race is about 1 per 1.000, between man and orang-utan about 2%, but to find a 30% difference is necessary to compare non the less man and mouse, man and ass, man and elephant! Can one consider mouse, ass and elephant as quasi-species of man? (pict. 5).

Particle detection Retrovirus are defined as particles of about 100-120nm of diameter with a core which includes a proteic coat and a ribonucleoprotein complex. Retroviruses are classified in three subfamilies: Spumavirinae, Lentivirinae and Oncovirinae. Retroviruses belonging to the last subfamily are divided in type A, B, C, and D particles. To which of these should belong HIV, is not very clear. According Gallo in 1984, it was a type C particle, but in 1985 he admitted it could be also a type D (83). Montagnier and coll. initially reported it was a type C particle (84), then a type D (85), and then a lentivirus (86), that is to say a different subfamily. According to Munn and others AIDS virus shows characteristics of type C, of type D and of lentivirus (87). Fauci and others described HIV in monocyte/macrophages cultures as retroviral particles with characteristics of type A (88). HIV identity seems to be so vague, so "shot", that it adds further reasons of perplexity. Photographs Several researchers in the AIDS field have shown HIV photographs, but those that can be seen are only virus-like viral particles indistinguishable from normal cellular microvesicles. These particles, in contrast with viruses, are very unstable when removed from their context, and it's difficult to isolate them and photograph them in a condition of a true isolation. On the contrary, viruses are stable because they have to leave again the cells and host organisms. The use of centrifugation techniques doesn't constitute a problem to separate viruses from various contaminants and so get their isolation - then photograph them, to put in evidence their proteins and their genetic constituents in a direct way. True viruses are so stable that it's easy to photograph directly them as tridimensional particles by an electronic scanning microscope, without the need to first fix them chemically. On the contrary, the microvesicles are so

unstable that can be photographed only by a transmission electronic microscope which requires that they be previously fixed chemically in ultra-thin sections. What has been shown to the world as HIV micro graphs are ultra thin sections which include particles indistinguishable from the cellular ones (89) (pict 6-8).

The evidence of HIV (non-)existence A noteworthy confirmation to the argued critics of the researchers from Perth came in march 1997: two groups, one French/German (90) and one from the American NCI (91), have published the photographs of density gradients in which pure HIV virus had to be present (pict. 9). These data should have been available by the first isolation of the virus (1983-84), but nobody showed them before. The most likely reason is the lack of correspondence between what they found and what they expected.

In the Franco/German study the pictures are from the 1.16 gm/ml band. It is impossible to tell from which density the pictures in the American study are taken but presumably it's the same 1.16 density for retroviral particles. Eleopulos and colleagues note that: "The authors of both papers concede that the particles which are present in the banded material and which are said to be HIV represent only a very small fraction of the total material. Gelderblom et al. state that the material contains 'an excess of [cellular] vesicles with a size range 50-500nm, as opposed to a minor population of virus particles... cellular vesicles appear... to be a major contaminant of HIV preparations enriched by sucrose gradient centrifugation'. 'For the small number of particles deemed to be 'HIV' no evidence is given that they are even a retrovirus-like particle. Indeed, to the contrary: (a) the particles do not appear to have surface spikes (knobs)... In other papers published by many researchers including Gelderblom and his associates such projections are noted to be absent (93, 94); (b) the particles referred to as 'HIV' are not spherical and have diameters exceeding 100-120 nm. In the EM in Gluschkof et al. (90) there are arrows pointing to five 'HIV' particles devoid of surface projections whose dimensions are 121 X 145; 121 X 169; 121 X 145, 121 X 145 and 133 X 145 nm respectively.

In Bess et al. (91) there are a total of six 'HIV particles' also devoid of surface projections whose dimensions are 160 X 240; 200 X 240; 280 X 280; 208 X 250; 167 X 250 and 250 X 292 and nm respectively. 'Actually, the authors maintain these are HIV particles, but without any proof. In the material of that density band there ought to be many viral particles, on the contrary they point only some, among many impurities.

They bear only the vaguest resemblance to retroviral particles'. 'The point is that any genuine retroviral particle contains a fixed amount of RNA and protein. No more and no less. This means that if we consider diameters of particles pointed in the two studies, they are 1.14 times to 1.96 times larger than the estimated maximum for a normal HIV particle. Translating this in volumes, and comparing them to a particle with a diameter of 120nm, the Franco/German particles have 50% more volume than a retroviral particle and the US particles have 750% more volume', that is to say incompati-

sero l'HIV in colture monocitarie/macrofagiche come particelle retrovirali con caratteristiche di tipo A⁽⁸⁸⁾.

L'HIV pare assumere un'identità così imprecisa, cangiante, da aggiungere ulteriori motivi di perplessità.

FOTOGRAFIE

Diversi ricercatori nel campo dell'AIDS hanno presentato fotografie del virus HIV, ma quelle che si vedono sono solo particelle similvirali indistinguibili da microvescicole cellulari normali. Queste particelle, in contrasto con i virus, sono molto instabili quando rimosse dal loro contesto, ed è difficile isolarle e fotografarle in uno stato di vero isolamento.

Viceversa i virus sono stabili perché essi devono lasciare di nuovo le cellule o gli organismi parassitati. L'uso di tecniche di centrifugazione non costituisce un problema per separare i virus dai vari contaminanti ed ottenere così il loro isolamento - quindi fotografarli, quindi evidenziare le loro proteine ed i loro costituenti genetici in modo diretto.

I virus veri sono così stabili che è facile fotografarli direttamente come particelle tridimensionali nel microscopio elettronico a scansione senza che sia necessario fissarli prima chimicamente.

All'opposto, le microvescicole sono così instabili che esse possono essere fotografate solo con un microscopio elettronico a trasmissione, che richiede che siano fissate chimicamente in sezioni molto sottili. Tutto ciò che è stato mostrato al mondo intero come micrografie dell'HIV sono sezioni ultrasottili che includono particelle indistinguibili da quelle cellulari⁽⁸⁹⁾ (vedi figg. 6-8).

LA PROVA DELL'(IN)ESISTENZA DELL'HIV

Una importantissima conferma alle argomentate critiche dei ricercatori di Perth è arrivata nel marzo del 1997: due gruppi, uno franco/tedesco⁽⁹⁰⁾ e uno del National Cancer Institute statunitense⁽⁹¹⁾, hanno finalmente pubblicato le fotografie dei gradienti di densità in cui doveva essere presente il virus HIV isolato, puro (fig. 9).

Questo dato avrebbe dovuto essere disponibile fin dal momento della scoperta del virus (1983-84), ma nessuno prima l'aveva fatto. Ed il motivo più verosimile è che manca totalmente la corrispondenza tra quello che era riscontrato e quello che avrebbe dovuto esserci.

Nello studio franco/tedesco le fotografie provengono dalla banda 1,16 gm/ml.

E' impossibile dire da quale densità provengono le fotografie dello studio americano, ma presumibilmente è anch'essa corrispondente a 1,16 gm/ml (dove si ritrovano i retrovirus).

La Eleopulos et al. rilevano⁽⁹²⁾ che "gli autori di entrambe le pubblicazioni ammettono che le particelle che sono presenti nel materiale della banda di gradiente e che sono definiti HIV rappresentano solo una frazione molto piccola del materiale totale. Gelderblom et al. affermano che il materiale contiene un eccesso di vescicole cellulari con una dimensione di 50-500 nm, come opposte ad una popolazione minore di particelle virali... le vescicole cellulari sembrano essere il maggiore contaminante delle preparazioni di HIV arricchite dalla centrifugazione in gradiente di sucrosio".

"Riguardo il piccolo numero di particelle considerate HIV non c'è nessuna prova che lo siano veramente.

Al contrario:

(a) le particelle non sembrano avere estroflessioni superficiali. In altri lavori pubblicati da diversi ricercatori, incluso Gelderblom e i suoi colleghi viene espressamente notata l'assenza di queste proiezioni^(93,94); (b) le particelle riferite come HIV non sono sferiche ed hanno diametri superiori a 100-120nm. Nella fotografia al microscopio elettronico di Gluschkof e coll.⁽⁹⁰⁾, ci sono frecce che puntano a 5 "virioni" senza proiezioni superficiali, le cui dimensioni sono: 121 X 145; 121 X 169; 121 X 145, 121 X 145 e 133 X 145 nm.

Nello studio di Bess e coll.⁽⁹¹⁾ sono indicate un totale di sei particelle di HIV, anch'esse prive di proiezioni di superficie, le cui dimensioni sono 160 X 240; 200 X 240; 280 X 280; 208 X 250; 167 X 250 and 250 X 292 and nm."

"In realtà, essi sostengono che quelle

sono particelle dell'HIV, ma senza fornire nessuna prova.

Nel materiale di quella banda di densità dovrebbero esserci moltissime particelle virali, invece ne sono indicate solo alcune, in mezzo a molte impurità.

Queste particelle hanno solo una vaga rassomiglianza con quelle che dovrebbero essere delle particelle retrovirali".

"Il punto fondamentale è che ogni genuina particella retrovirale dovrebbe contenere la stessa quantità di RNA e proteine, né più né meno. Questo significa che se noi consideriamo i diametri delle particelle indicate nei due studi citati, essi sono da 1,14 a 1,96 volte più grandi del massimo previsto per il normale HIV. Traducendo questo in volumi, e confrontando con una particella con diametro di 120nm, le particelle franco/tedesche hanno un volume 50% maggiore, quelle statunitensi uno 750% maggiore", ovvero incompatibile con la definizione di retrovirus! Anche se non è ammesso dagli autori, i dati dei due lavori citati contribuiscono a dimostrare che là dove doveva essere presente l'HIV puro, dell'HIV non c'è traccia.

CONCLUSIONI

Nessuno dei test esaminati appare sufficientemente sicuro per individuare un'infezione da HIV. Paradossalmente neppure la "determinazione diretta del virus" è in grado di rispondere allo stesso quesito, tanto è vero che vi è una inconciliabile discordanza dei risultati ottenuti con le varie metodiche che ne vengono perciò invalidati.

In più non risulta dimostrata l'esistenza di un'entità che possa ragionevolmente chiamarsi "il virus HIV", sia nelle sue componenti proteiche, sia nel genoma, sia come particella fisica. Il vero significato dei test è meglio compreso se viene esaminata la loro origine.

Per provare l'esistenza di un nuovo virus sia il gruppo di Montagnier nel 1983 che quello di Gallo nel 1984 separarono il soprannatante di colture ritenute infette in gradienti di densità. Considerarono - erroneamente - che il materiale che si separava al livello di 1,16 mg/ml fosse costituito da "pure particelle di HIV".

Le proteine presenti in questa banda e che sono reattive con i sieri di pazienti con AIDS (ma non solo con i loro sieri) furono considerate proteine dell'HIV. Ugualmente, una particolare frazione di RNA ritrovata nella medesima banda di separazione fu considerata il genoma del nuovo virus. Da allora, alcune di queste proteine sono usate per ricavare i reattivi per alcuni test o come immunogeni per produrre negli animali di laboratorio gli anticorpi utilizzati per altri test (un procedimento simile venne seguito con certi frammenti di RNA). A questo punto la spiegazione degli esperimenti di Gallo effettuati nel 1984 appare più chiara: utilizzò un miscuglio di proteine (ritenute virali ma in realtà cellulari) per immunizzare i conigli ed ottenere così un siero che ovviamente reagiva con le stesse proteine presenti nelle colture da cui proveniva⁽⁹⁵⁾.

In altre parole Gallo ha creduto di dimostrare la sua ipotesi (l'esistenza del virus) con altre ipotesi rivelatesi errate (che l'attività transcriptasica inversa, la presenza di particelle similvirali, gli anticorpi in quel modo trovati fossero specifici per il virus). Così sono nati i test che ancora oggi vengono utilizzati e perfezionati per porre una diagnosi così impegnativa. Una importante prova della correttezza di questa interpretazione dei fatti sta nei risultati che vennero ottenuti su topi e scimmie nel 1991⁽⁹⁶⁾. In questi studi, allo scopo di valutare un potenziale vaccino, alcuni animali di laboratorio vennero iniettati con componenti cellulari da colture *non infette con l'HIV*: i risultati furono simili a quelli ottenuti con il "vaccino vero e proprio" (cioè con "virus da colture infette").

Nessuna differenza significativa venne rilevata, tanto che il commento perfettamente appropriato ed ancora attuale di John Maddox fu: "la ricerca sull'AIDS si è capovolta".

In altre parole, per aver ottenuto quei risultati non c'era alcun bisogno di ipotizzare la presenza di un virus HIV.

Fabio Franchi
Specialista in Igiene,
Medicina Preventiva
e in Malattie Infettive
Trieste

ble with the same definition of a retrovirus! Even if the authors do not admit it, the data of the two cited papers contribute to show that where should be present pure HIV, of HIV there is no trace.

CONCLUSION

None of the tests examined seems to be sufficiently sure to detect an HIV infection. Paradoxically not even the "direct virus detection" is able to do answer to the same question. As a matter of facts there is an incompatible discordance among the results obtained with different methods. These discordances are by themselves logical incompatibilities that invalidate them. Besides, the existence of an entity that one can reasonably name "HIV virus" is not proved, as far as its proteins, its genome, its physical particle are concerned. The true meaning of the tests is better understood if its origin is examined. To show the existence of a new virus, both Montagnier group in 1983 and the group of Gallo in 1984 separated supernatant of cultures they considered infected in density gradients. They erroneously considered that the material that banded at 1,16 mg/ml was constituted by "pure HIV particles". The proteins which were present in this band and were reactive with AIDS patients sera (but not only with their sera) were considered HIV proteins. In the same manner, a particular fraction of RNA which they found in the same band was considered the genome of the new virus. By then, some of these proteins are used to get the reagent for some kind of tests or as immunogens to produce in laboratory animals the antibodies used for other kind of tests (similar procedure was followed to obtain RNA segments).

At this point the explanation of Gallo experiments in 1984 appears clearer: he used a mixture of proteins (believed to be viral but in fact cellular) to immunize the rabbits and obtain a serum which obviously reacted with the same proteins that were in the culture from which the initial mixture came⁽⁹⁵⁾.

In other words Gallo believed to show an hypothesis (the existence of the virus) with other hypothesis shown to be false (that is to say that inverse transcription activity, the presence of virus-like particles, the antibodies obtained in the way just mentioned were all virus specific).

In this way were born the tests which to-day are still used and perfected to put so engaging a diagnosis. An important prove of the correctness of this interpretation of the facts stays in the results that they obtained on mice and monkeys in 1991⁽⁹⁶⁾.

In those studies, with the scope to evaluate a candidate vaccine, some laboratory animals were injected with cellular components from cultures which were "not infected by HIV": the results were similar to those obtained with "the real vaccine" (i.e. with virus from "infected cultures").

No significant difference was found, so that the comment - perfectly suited and still up to date of John Maddox - was: "AIDS research turned upside down".

That is to say that it wasn't necessary at all to hypothesize the presence of a virus to obtain those phenomena.

BIBLIOGRAFIA E NOTE

- 1) Maddox J. **Finding wood among the trees.** *Nature* 1988; 335:11.
- 2) Metcalf JA, Davey Jr. RT and Lane C. **Serologic and Virologic tests.** In De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Curran J, Essex M and Fauci AS. *AIDS: Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention*, 4th edition. Lippincott-Raven Publishers, 1997; pp. 177-195.
- 3) Ministero della Sanità. Dipartimento per la valutazione dei medicinali e la farmacovigilanza. **Linee guida per la terapia antiretrovirale dell'infezione da HIV.** Bollettino d'informazione sui farmaci 1996; 6:7-3-13.
- 4) Commissione Nazionale per la Lotta all'AIDS. **Gli screening per gli anticorpi anti-HIV.** *The Practitioner* (ed. it.) 1987; 3:101-120.
- 5) Voevodin A. **HIV screening in Russia (letter).** *Lancet* 1992; 339:1548.
- 6) Lundberg GD. **Serological Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection by Western Blot Testing.** *JAMA* 1988; 260:674-679.
- 7) Ministero della Sanità. **AIDS - la diagnosi, il test, il counselling.** 1992.
- 8) Meyer KB and Pauker SG. **Screening for HIV: Can we afford the false positive rate?** *NEJM* 1987; 317: 238-241.
- 9) Zolla-Pazner S. et al. **Reinterpretation of HIV Western Blot Patterns.** *N Eng J Med* 1989; 320:1280-1.
- 10) Midthum K, Garrison L, et al. **Frequency of indeterminate Western Blot tests in healthy adults at low risk for HIV infection.** *J Infect Dis* 1990; 162:1379-82.
- 11) Mac Kenzie WR et al. **Multiple False - positive Serologic tests for HIV, HTLV-1, and Hepatitis C Following Influenza Vaccination.** *Jama* 1991; 268:1015-17.
- 12) Kozhemiakin LA, Bondarenko IG. **Genomic instability and AIDS.** *Biochimica* 1992; 57:1417-1426.
- 13) Strandstrom HV, Higgins JR, Mossie K, et al. **Studies with canine sera that contain antibodies which recognize human immunodeficiency virus structural proteins.** *Cancer Res* 1990; 50:5628s-5630s.
- 14) Eleopoulos EP, Turner VF and Papadimitriou JM. **Is a positive Western Blot Proof of HIV Infection?** *Bio/Technology* 1993; 11:696-707.
- 15) Vogt **Advances in virus research.** 1965; 11:293-383.
- 16) Bourinbaier AS. **HIV and GAG.** *Nature* 1991; 349:111. (100 pg p24 equivalent to 1.000.000 HIV particles).
- 17) Bialy H. **Where is the virus? and where is the press?** *BIO/Technology* 1988; 6:121.
- 18) Bourinbaier AS. **HIV and GAG.** *Nature* 1991; 349:111.
- 19) Paul DA, Falk LA, Kessler A et al. **Correlation of serum HIV antigen and antibody with clinical status in HIV-infected patients.** *J Med Virol* 1987; 22(4): 357-63.
- 20) Todak G, Klein E, Lange M et al. **A clinical appraisal of the p24 Antigen test.** p. 326. In: Vol. I, Abstracts VII International Conference on AIDS, Florence, 1991.
- 21) Delord B, Ottmann M, Schrive MH et al. **HIV-1 expression in 25 infected patients: A comparison of RNA PCR, p24 EIA in Plasma and in situ Hybridization in mononuclear cells.** p. 113. In: Vol. I, Abstracts VII International Conference on AIDS, Florence, 1991.
- 22) Genesca J, Jett BW, Epstein JS & Bloggs. **What do Western Blot indeterminate patterns for Human Immunodeficiency Virus mean in EIA-negative blood donors?** *Lancet* 1989; ii:1023-1025.
- 23) Mortimer P, Codd A, Connolly J, et al. **Towards error free HIV diagnosis: notes on laboratory practice.** *Pub Health Lab Service Microbiol Digest* 1992; 9:61-64.
- 24) Valore Predittivo Positivo = VP/(VP+FP); VP = veri positivi, FP = falsi positivi.
- 25) Poiesz B, Ruscetti FW, Mier JW, et al. **T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor.** *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77:6815-6819.
- 26) Schüpbach J, Jendis JB, Bron C et al. 1992. **False-positive HIV-1 virus cultures using whole blood.** *AIDS* 6: 1545-1546.
- 27) Gallo RC, Sarin PS and Wu AM. **On the nature of the Nucleic Acids and RNA Dependent DNA Polymerase from RNA Tumor Viruses and Human Cells.** p. 13-34. In: Possible Episomes in Eukaryotes. LG Silvestri (Ed.). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1973.
- 28) Whitkin SS, Higgins PJ and Bendich A. **Inhibition of reverse transcriptase and human sperm DNA polymerase by anti-sperm antibodies.** *Clin Exp Immunol* 1978; 33:244-251.
- 29) Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Gallo RC. **DNA polymerases of normal and neoplastic mammalian cells.** *Biochim Biophysica Acta* 1978; 516:419-487.
- 30) Weissbach A, Baltimore D, Bollum F, et al. **Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases.** *Science* 1975; 190:401-402.
- 31) Robert-Guroff M, Schrecker AW, Brinkman BJ, et al. **DNA polymerase gamma of human lymphoblasts.** *Biochem* 1977; 16:2866-2873.
- 32) Lewis BJ, Abrell JW, Smith RG, et al. **Human DNA polymerase III (R-DNA): Distinction from DNA polymerase I and reverse transcriptase.** *Science* 1974; 183:867-869.
- 33) Weissbach A, Baltimore D, Bollum F, et al. **Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases.** *Science* 1975; 190:40-402.
- 34) Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. **Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS.** *Science* 1984; 224:500-502.
- 35) Dourmashkin RR, O'Toole CM, Bucher D, Oxford JS. **The presence of budding virus-like particles in human lymphoid cells used for HIV cultivation.** *VIIth International Conference on AIDS.* Florence: 1991:122.
- 36) Minassian A, Merges M, Garrity R, et al. **Induction of a SMRV-like retrovirus from a human T-cell line after treatment with the mutagen ethyl-methyl-sulfonate.** *J Acquir Immun Defic Syndr* 1993; 6 (No 6):738.
- 37) Gallo RC, Wong-Staal F, Reitz M et al. 1976. **Some Evidence For Infectious Type-C Virus in Humans.** p. 385-407. In: *Animal Virology.* D Baltimore, AS Huang, CF Fox (Eds.). Academic Press Inc., New York.
- 38) Panem S, Prochownik EV, Reale FR et al. **Isolation of Type C Virions from a Normal Human Fibroblast Strain.** *Science* 1975; 189:297-299.
- 39) Panem S, Prochownik EV, Knish WM and Kirsten WH. **Cell Generation and Type-C Virus Expression in the Human Embryonic Cell Strain HEL-12.** *J Gen Virol* 1977; 35:487-495.
- 40) Panem S. **C Type Virus Expression in the Placenta.** *Curr Top Pathol* 1979; 66:175-189.
- 41) Brennan JK, Lichtman MA, Chamberlain, JK and Leblond P. **Isolation of Variant Lymphoma Cells with Reduced Growth Requirements for Extracellular Calcium and Magnesium and Enhanced Oncogenicity.** *Blood* 1976; 47:447-459.
- 42) Garry RF, Fermin CD, Hart DJ et al. **Detection of a Human Intracisternal A-Type Retroviral Particle Antigenically Related to HIV.** *Science* 1990; 250:1127-1129.
- 43) O'Hara CJ, Groopmen JE and Federman M. **The Ultrastructural and Immunohistochemical Demonstration of Viral Particles in Lymph Nodes from Human Immunodeficiency Virus-Related Lymphadenopathy Syndromes.** *Hum Pathol* 1988; 19:545.
- 44) Shaw GM, Hahn BH, Suresh KA et al. **Molecular Characterization of Human T-Cell Leukemia (Lymphotropic) Virus Type III in the Acquired Immune Deficiency Syndrome.** *Science* 1984; 226: 1165-1171.
- 45) Schleupner CJ. **Detection of HIV-1 infection.** In Mandell/Douglas/Bennet. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Churchill-Livingstone, IV Edition, 1995: 1253-67.
- 46) Lanka S. **HIV: reality or artifact?** *Continuum May* 1995; 4-9.
- 47) Imagawa D, Detels R. **HIV-1 seronegative homosexual man.** *N Engl J Med* 1991; 325:1250-1.
- 48) Sloan EM et al. **HIV testing - State of the Art (Review).** *JAMA* 1991; 266:2861-6.
- 49) Defer C et al. **Multicentre quality control of polymerase chain reaction for detection of HIV DNA.** *AIDS* 1992; 6:659-63.
- 50) Busch MP, Henrard DR, Hewlett IK et al. **The Transfusion Safety Study Group. Poor sensitivity, specificity, and reproducibility of detection of HIV-1 DNA in serum by polymerase chain reaction.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5(9): 872-7.
- 51) Paul MO, Tetali S, Lesser ML et al. **Laboratory diagnosis of infection status in infants perinatally exposed to human immunodeficiency virus type 1.** *J Infect Dis* 1996, Jan; 173(1): 68-76.
- 52) Bootman JS, Kitchin PA. **An international collaborative study to assess a set of**

CURRICULUM VITAE FABIO FRANCHI

Laureato in Medicina e Chirurgia nel 1977 a Trieste.

Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva a Trieste e in Clinica delle Malattie Infettive a Siena nel 1991.

Medico Ospedaliero presso L'Ospedale di Trieste.

E' stato per alcuni anni docente di Metodologia Scientifica all'Università di Trieste (Specializzazione in Medicina Interna).

Studioso di teoria e tecnica della metodologia scientifica, partecipa ai lavori del Gruppo per la rivalutazione scientifica dell'ipotesi HIV/AIDS fin dalla sua costituzione.

Ha scritto diversi articoli su argomenti controversi in medicina.

E' autore con Luigi De Marchi del libro "AIDS, la grande truffa", pubblicato nel 1996, in cui vengono affrontati in maniera sintetica e comprensibile a tutti i grandi paradossi della teoria virale dell'AIDS, le frodi che ne sono alla base, sostenendo le sue tesi con una adeguata bibliografia.

reference reagents for HIV-1 PCR. J Vir Meth 1992; 5:872.

53) Sheppard HW, Ascher MS, Busch MP et al. **A multicenter proficiency trial of gene amplification (PCR) for the detection of HIV-1.** J Acquir Immune Defic Syndr. 1991; 4(3): 277-83.

54) Schuurman R, Descamps D, Weverling GJ, et al. **Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma.** J Clin Microbiol. 1996 Dec; 34(12): 3016-22.

55) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. **Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.** Nature 1995; 373:123-126.

56) Wei X, Ghosh SK, Taylor M, et al. **Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.** Nature 1995; 373:117-122.

57) Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, et al. **Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers.** J Virol 1990; 64:864-872.

58) Maddox J. (review of Hodgkinson book AIDS, the failure of contemporary science) The Guardian Newspaper 1996 July 5th; page 16.

59) Coste J, Montes B, Reynes J, et al. **Comparative evaluation of three assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma.** J Med Virol. 1996 Dec; 50(4): 293-302.

60) Vandamme AM, Schmit JC, Van Dooren S, et al. **Quantification of HIV-1 RNA in plasma: comparable results with the NASBA HIV-1 RNA QT and the AMPLICOR HIV monitor test.** J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996 Oct 1; 13(2): 127-39.

61) Gobbers E, Fransen K, Oosterlaken I, et al. **Reactivity and amplification efficiency of the NASBA HIV-1 RNA amplification system with regard to different HIV-1 subtypes.** J Virol Methods. 1997 Jul; 66(2):

293-301.

62) Schwartz DH, Laeyendecker OB, Arango Jaramillo S, et al. **Extensive evaluation of a seronegative participant in an HIV-1 vaccine trial as a result of false-positive PCR.** Lancet 1997 Jul 26; 350(9073): 256-9.

63) Piatak MJ, Saag MS, Yang LC, et al. **High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR.** Science. 1993; 259:1749-1754.

64) Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. **Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection.** N Engl J Med. 1995; 332:201-208.

65) Perelson AS et al. (Ho D included). **HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time.** Science 1996; 271:1582-6.

66) Palca J. **Draft of Gallo Report Sees the Light of Day.** Science 1991; 253:1347-1348.

67) Cohen J. HHS. **Gallo Guilty of Misconduct.** Science 1993; 259:168-170.

68) Buianouckas FR. **HIV an illusion.** Nature 1995; 375:197.

69) Eleni Papadopoulos Eleopoulos, Valendar F Turner, John M Papadimitriou, David Causer. **The isolation of HIV - has it really been achieved?** Continuum Sept/Oct 1996; 4(3) S:1-24.

70) Brown P. **The strains of the HIV war.** New Scientist 1991; (25th May):14-15.

71) Salimen MO, Carr JK, Burke DS, et al. **Genotyping of HIV-1.** The human retroviruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1996: 30-34.

72) Zhu T, Wang N, Carr A, et al. **Evidence of coinfection of multiple strains of human immunodeficiency virus type 1 B an acute seroconverter.** J Virol 1995; 69:1324-1327.

73) Kozal MJ, Shah N, Shen N, et al. **Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays.** Nat Med 1996; 2:753-759.

74) Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA, Yoshida M. **HIV/HTLV gene nomenclature.** Nature 1988; 333:504.

75) Lazo PA, Tsichlis PN. **Biology and pathogenesis of retroviruses.** Semin Oncol 1990; 17:269-294.

76) Cunningham AL, Dwyer DE, Mills J, et al. **Structure and function of HIV.** Med J Aust 1996; 164:161-173.

77) Barré-Sinoussi F. **HIV as the cause of AIDS.** Lancet 1996; 348:31-35.

78) Wain-Hobson S. **Virological mayhem.** Nature 1995; 373:102.

79) Blomberg J, Lawoko A, Pipkorn R, et al. **A survey of synthetic HIV-1 peptides with natural and chimeric sequences for differential reactivity with Zimbabwean, Tanzanian and Swedish HIV-1-positive sera.** AIDS 1993; 7:759-767.

80) Myers G. **Nucleic acids alignments and sequences.** The human retroviruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1995: 1-1-2.

81) Barré-Sinoussi F. **HIV as the cause of AIDS.** Lancet 1996; 348:31-35.

82) Salimen MO, Carr JK, Burke DS, et al. **Genotyping of HIV-1.** The human retro-

viruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1996: 30-34.

83) Gallo RC, Shaw GM, Markham PD. **The etiology of AIDS.** In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA, ed. AIDS etiology, diagnosis, treatment, and prevention. New York: J. B. Lippincott Company, 1985: 31-51.

84) Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F. **Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS).** Science 1983; 220:868-871.

85) Klatzmann D, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT. **Selective Tropism of Lymphadenopathy Associated Virus (LAV) for Helper-Inducer T Lymphocytes.** Science 1984; 225:59-63.

86) Montagnier L. **Lymphadenopathy-Associated Virus: From Molecular Biology to Pathogenicity.** Annals of Internal Medicine 1985; 103:689-693.

87) Munn RJ, Preston MA, Yamamoto JK, Gardner MB. **Ultrastructural comparison of the retroviruses associated with human and simian acquired immunodeficiency syndromes.** Laboratory Investigation 1985; 53:194-199.

88) Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman HE. **Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study.** Journal of Virology 1988; 62:2578-2586.

89) Lanka Stephan. **No viral identification: non cloning as proof of isolation!** Continuum Feb/March 1997; 4(5):31-33.

90) Gluschkoff P, Mondor I, Gelderblom HR, Sattentau QJ. **Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations.** Virol. 1997; 230:125-133.

91) Bess JW, Gorelick RJ, Bosche WJ, et al. **Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations.** Virol 1997; 230:134-144.

92) Eleni Papadopoulos-Eleopoulos. **A critique of the evidence for the isolation of HIV (A summary of the views of Papadopoulos et al.)** Rethinking aids web site (<http://www.virusmyth.com/aids>) epsummary.htm 1997.

93) Gelderblom HR, Ozel M, Hausmann EHS, Winkel T, Pauli G, Koch MA. **Fine Structure of Human Immunodeficiency Virus (HIV), Immunolocalization of Structural Proteins and Virus-Cell Relation.** Micron Microscopica 1988; 19:41-60.

94) Hockley DJ, Wood RD, Jacobs JP. **Electron Microscopy of Human Immunodeficiency Virus.** J Gen Virol 1988; 69:2455-2469.

95) Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, et al. **Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS.** Science 1984; 224:497-500.

96) Maddox J. **Aids research turned upside down.** Nature 1991; 353:2.